O I P E
APR 0 1 2002
PATENT & TRADEMARK OFFICE

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re U.S. Patent Application of)
)
ROKUTAN et al.)
)
Application Number: 10/083,550)
)
Filed: February 27, 2002)
)
For: METHOD FOR EVALUATING DNA PROBES POSITION ON SUBSTRATE)

Honorable Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

NOTICE OF PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. § 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority dates of February 28, 2001 and January 31, 2002, the filing dates of the corresponding Japanese patent applications 2001-053465 and 2002-022682.

The certified copies of corresponding Japanese patent 2001-053465 and 2002-022682 are being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copy is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,

Stanley P. Fisher
Registration Number 24,344
JUAN CARLOS A. MARQUEZ
Registration No. 34,072

REED SMITH LLP
3110 Fairview Park Drive
Suite 1400
Falls Church, Virginia 22042
(703) 641-4200

April 1, 2002

O!PE JC48 APR 0 1 2002 PATENT & TRADEMARK OFFICE

日　本　国　特　許　庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: ２００１年　２月２８日

出願番号
Application Number: 特願２００１－０５３４６５

[ST.10/C]: [ＪＰ２００１－０５３４６５]

出願人
Applicant(s): 株式会社日立製作所

２００２年　３月　５日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office 及川耕造

出証番号　出証特２００２－３０１３３５６

【書類名】　特許願

【整理番号】　H01001741A

【あて先】　特許庁長官　殿

【国際特許分類】　C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】　東京都千代田区神田駿河台四丁目６番地　株式会社日立製作所ライフサイエンス推進事業部内

【氏名】　富田　裕之

【発明者】

【住所又は居所】　大阪市淀川区東三国２丁目１１番３０－３０３

【氏名】　六反　一仁

【発明者】

【住所又は居所】　東京都千代田区神田駿河台四丁目６番地　株式会社日立製作所ライフサイエンス推進事業部内

【氏名】　斎藤　俊郎

【特許出願人】

【識別番号】　000005108

【氏名又は名称】　株式会社　日立製作所

【代理人】

【識別番号】　100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】　作田　康夫

【電話番号】　03-3212-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】　013088

【納付金額】　21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】　明細書　1

【物件名】　図面　1

【物件名】　　要約書　1

【プルーフの要否】　　要

出証特２００２－３０１３３５６

【書類名】　明細書

【発明の名称】　オリゴヌクレオチドアレイおよび検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項１】

塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化したアレイであって、かつ前記オリゴヌクレオチドを生体のストレス反応に関与する遺伝子あるいは前記遺伝子の相補配列鎖とし、かつ前記オリゴヌクレオチドを遺伝子機能により分類して、前記分類ごとに支持体上の固定化領域を分けたことを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項２】

塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化したアレイであって、生体レベルのストレス応答に関する遺伝子と細胞レベルのストレス応答に関する遺伝子、もしくは前記遺伝子の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが、少なくとも３０種類以上固定化されており、かつ校正用内部・外部標準遺伝子及び、前記ストレス応答に関する遺伝子のみを固定化したことを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項３】

前記請求項２に記載したオリゴヌクレオチドアレイにおいて、請求項２記載の生体レベルのストレス応答に関する遺伝子を、神経系、内分泌系、免疫系のそれぞれに関与するかもしくは、神経系と内分泌系、神経系と免疫系、内分泌系と免疫系を相互に関連づける仲介因子群と関連する遺伝子とし、かつ請求項２記載の細胞レベルのストレス応答に関する遺伝子を、熱ショックタンパク質（Ｈｅａｔ　Ｓｈｏｃｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）等のストレス耐性遺伝子とすることを特徴とする請求項２記載のオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項４】

塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化したアレイであって、（１）校正用内部・外部標準遺伝子、（２）熱ショック蛋白質などのストレス耐性遺伝子とストレスにより減少する性ホルモンな

どのホルモン遺伝子、（３）免疫応答・炎症反応を誘導するサイトカイン遺伝子、（４）細胞死を誘導する機能を有する遺伝子、（５）グルココルチコイド、ＴＧＦβ、ＦＧＦなどの抗炎症、創傷治癒に関与する遺伝子や増殖抑制遺伝子、（６）免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子、（７）細胞障害を引き起こすサイトカインの誘導にかかわる転写因子やシグナル分子、（８）増殖にかかわる転写因子やシグナル分子、（９）ストレス耐性にかかわる転写因子やシグナル分子などの遺伝子、あるいは前記遺伝子の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを、同一の支持体上に固定化したことを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項５】

前記請求項４に記載したオリゴヌクレオチドアレイにおいて、請求項４記載（１）のオリゴヌクレオチドを中央部に、請求項４記載の（２）～（９）オリゴヌクレオチドを周辺部に配置し、かつ請求項４記載の（２）と（４）を互いに対角線上の反対方向に、請求項４記載の（３）と（５）を互いに対角線上の反対方向に、請求項４記載の（６）と（８）を互いに対角線上の反対方向に、請求項４記載の（７）と（９）を互いに対角線上の反対方向に、それぞれ配置したことを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項６】

前記請求項４に記載したオリゴヌクレオチドアレイにおいて、請求項４記載（１）のオリゴヌクレオチドを中央部に、請求項４記載（３）と（６）を第１象現（ショウゲン）、請求項４記載（２）と（９）を第２象現、請求項４記載（５）と（８）を第３象現、請求項４記載（４）と（７）を第４象現に、それぞれ配置したことを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項７】

前記請求項４に記載したオリゴヌクレオチドアレイおいて、請求項６記載のオリゴヌクレオチド配置の、点対称もしくは線対象の配置としたことを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項８】

塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを支持体上に固定化した第一のオリ

ゴヌクレオチドアレイを用いて、網羅的に遺伝子発現解析を行うことで発現量に変化が見られる遺伝子群及び前記遺伝子群と関連する遺伝子群を選定し、前記遺伝子群及び前記関連遺伝子群の、あるいは前記遺伝子群及び前記関連遺伝子群の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを支持体上に固定化した第二のオリゴヌクレオチドアレイを作製し、前記第二のオリゴヌクレオチドアレイを用いて遺伝子発現解析を行う遺伝子発現解析方法。

【請求項９】

ヒト末梢血由来の白血球（Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ）から得られたＲＮＡを鋳型として逆転写酵素反応を行って相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を合成する際に、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化し、かつ前記オリゴヌクレオチドを生体のストレス反応に関与する遺伝子あるいは前記遺伝子の相補配列鎖とし、かつ前記オリゴヌクレオチドを遺伝子機能により分類して、前記分類ごとに支持体上の固定化領域を分けたオリゴヌクレオチドアレイとハイブリダイズすることでストレスの程度を評価するストレス解析方法。

【請求項１０】

ヒト末梢血由来の単球（Ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、好中球（Ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌ）、リンパ球（Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ）のいずれか一つ以上から得られたＲＮＡを鋳型として逆転写酵素反応を行ってｃＤＮＡを合成する際に、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化し、かつ前記オリゴヌクレオチドを生体のストレス反応に関与する遺伝子あるいは前記遺伝子の相補配列鎖とし、かつ前記オリゴヌクレオチドを遺伝子機能により分類して、前記分類ごとに支持体上の固定化領域を分けたオリゴヌクレオチドアレイとハイブリダイズすることでストレスの程度を評価するストレス解析方法。

【請求項１１】

ヒト末梢血由来の単球、好中球、リンパ球の３者から得られたＲＮＡを、それぞれ鋳型として逆転写酵素反応を行ってそれぞれのｃＤＮＡを合成し、標識物質を

結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したそれぞれのｃＤＮＡを、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化し、かつ前記オリゴヌクレオチドを生体のストレス反応に関与する遺伝子あるいは前記遺伝子の相補配列鎖とし、かつ前記オリゴヌクレオチドを遺伝子機能により分類して、前記分類ごとに支持体上の固定化領域を分けたオリゴヌクレオチドアレイとそれぞれハイブリダイズし、単球由来ＲＮＡ、好中球由来ＲＮＡ、リンパ球由来ＲＮＡの３者間でハイブリダイズ結果を比較することでストレスの程度を評価するストレス解析方法。

【請求項１２】

ヒト末梢血から得られたＲＮＡを鋳型として逆転写酵素反応を行って相補ＤＮＡを合成する際に、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、オリゴヌクレオチドアレイとハイブリダイズする検査方法。

【請求項１３】

ヒト末梢血由来の白血球（Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ）から得られたＲＮＡを鋳型として逆転写酵素反応を行って相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を合成する際に、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化し、生体レベルのストレス応答に関する遺伝子と細胞レベルのストレス応答に関する遺伝子、もしくは前記遺伝子の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが、少なくとも３０種類以上固定化されており、かつ校正用内部・外部標準遺伝子及び、前記ストレス応答に関する遺伝子のみを固定化したオリゴヌクレオチドアレイとハイブリダイズすることでストレスの程度を評価するストレス解析方法。

【請求項１４】

ヒト末梢血由来の単球（Ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、好中球（Ｎｅｕｔｒｏｐｈｉｌ）、リンパ球（Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ）のいずれか一つ以上から得られたＲＮＡを鋳型として逆転写酵素反応を行ってｃＤＮＡを合成する際に、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、標識物質を結合ないしは

鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化し、生体レベルのストレス応答に関する遺伝子と細胞レベルのストレス応答に関する遺伝子、もしくは前記遺伝子の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが、少なくとも３０種類以上固定化されており、かつ校正用内部・外部標準遺伝子及び、前記ストレス応答に関する遺伝子のみを固定化したオリゴヌクレオチドアレイとハイブリダイズすることでストレスの程度を評価するストレス解析方法。

【請求項１５】

ヒト末梢血由来の単球、好中球、リンパ球の３者から得られたＲＮＡを、それぞれ鋳型として逆転写酵素反応を行ってそれぞれのｃＤＮＡを合成し、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したそれぞれのｃＤＮＡを、標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませて標識化したｃＤＮＡを、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異なる位置に固定化し、生体レベルのストレス応答に関する遺伝子と細胞レベルのストレス応答に関する遺伝子、もしくは前記遺伝子の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが、少なくとも３０種類以上固定化されており、かつ校正用内部・外部標準遺伝子及び、前記ストレス応答に関する遺伝子のみを固定化したオリゴヌクレオチドアレイとそれぞれハイブリダイズし、単球由来ＲＮＡ、好中球由来ＲＮＡ、リンパ球由来ＲＮＡの３者間でハイブリダイズ結果を比較することでストレスの程度を評価するストレス解析方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ストレスの程度を簡便に評価するためのＤＮＡアレイ及びそれを用いたストレス解析方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

生活習慣病やアトピー・アレルギー疾患の増加が、今日の国民の医療負担を増

大させる要因の一つとなっている。また、自殺の増加、犯罪の低年齢化、心的外傷後ストレス症候群（Ｐｏｓｔ　Ｔｒａｕｍａｔｉｃ　Ｓｔｒｅｓｓ　Ｄｉｓｏｒｄｅｒ，　ＰＴＳＤ）患者の増加などが近年報告されている。これら生活習慣病、アレルギー疾患、自殺、犯罪、ＰＴＳＤなどの社会問題の背景として、ストレスが関与しているのは医療専門家の一致した意見である。

ストレスの定義は、生体が急激な侵襲を受けた際、個々の侵襲に対する特異的な反応に加えて、侵襲の種類によらず一定のパターンを示す非特異的反応の総体である。ストレスをもたらす刺激（ストレッサー）として、異常温度、火傷、炎症、免疫反応、騒音、電気ショック、紫外線、放射線、細菌毒素、細菌、ウイルス、手術、運動、痛覚刺激、身体拘束、低酸素、低血糖、虚血、試験、対人摩擦、肉親の死、孤独、失恋、絶望、落胆、社会不安、戦争、テロ活動、地震などがあげられる。生体ホメオスターシス維持機構の知見の増加により、生体の三大調節機構である神経、内分泌、免疫系の異常とストレスとが密接にかかわっていることが明らかとなった。

【０００３】

【発明が解決しようとする課題】

しかし現状では、ストレスの程度を客観的に評価する医学生理学的な診断方法は開発されていない。例えば、カテコールアミンや副腎皮質ホルモンなどのいわゆるストレスホルモンの血中濃度を測定しても、個人差や経時的な変化が大きく、ストレス刺激に対して一律に変化するわけではないので、ストレスの程度を評価するには不十分であることが知られている。加えて、これらの限られたストレスホルモンのみを測定しても生体の反応を評価することは極めて困難である。これはストレスが複雑系の反応であり多角的な評価が必要とされるためである。一方、ストレスは社会心理学の分野でも研究され、インタビューテストやアンケート形式などの心理テストによりストレスの程度を評価する方法が開発されているが、その心理テストは生体反応を生理学的に十分に裏付けているとは言いがたい。すなわち、個人のストレスを客観的に評価する方法は極めて乏しいのが現状である。しかしストレスは、自律神経異常、内分泌異常、免疫異常、胃潰瘍・急性胃粘膜病変、精神疾患、生殖機能低下などと関連する重要現象である。専門医療機

関はもとより、一般の開業医、企業や学校の診断設備、検診センター等で手軽にストレスの程度を評価することが可能となれば、それを家庭、職場、学校等における日常生活にフィードバックできるので有益である。そのような観点からストレスの程度を調べることに的を絞った診断機器の開発が求められていた。

本発明の目的は、ストレスの程度を簡便、低コストでかつ信頼性高く調べることができる診断方法、特にはオリゴヌクレオチドアレイを提供することにある。特に、ストレスの程度を調べる上で不可欠な遺伝子群を特定することでアレイ上に載せるＤＮＡ断片の数を必要最小限とし、再現性・信頼性の高いストレス解析用アレイを提供することを目的になされたものである。

【０００４】

【課題を解決するための手段】

前述のように、ストレスは神経系、内分泌系、免疫系などの種々の臓器が関連する複雑系の反応であり多角的な評価が不可欠である。この複雑系の現象であるストレス反応を遺伝子レベルで表現すれば、複数のストレス関連遺伝子群のスイッチがオンオフされることで、ストレス関連の蛋白質量が増減し、それら蛋白質活性全体のバランスで生体機能調節がなされていると考えられる。すなわちストレス関連遺伝子群のオンオフの異常が、結果として蛋白質活性のバランスの異常となり、ストレスのような生体機能調節の異常として現れるに違いない。遺伝子のオンオフとは、例えば遺伝子発現量の増加ないしは減少により制御されている。遺伝子発現量は、メッセンジャーＲＮＡ量、もしくは蛋白質量を指標として測定することができる。現在の技術ではメッセンジャーＲＮＡ量を指標とする方が、蛋白質を指標とするより、極めて簡便に測定が行える。そこで、ストレスを簡便に評価するには、ストレスに関連する複数遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ発現量の増減を同時に観察すればよい。この目的には、近年開発されたＤＮＡアレイ（オリゴヌクレオチドアレイとも呼ばれる）が最も適している。

ＤＮＡアレイ（オリゴヌクレオチドアレイ）は、複数のＤＮＡ断片（オリゴヌクレオチド）を基板上に固定化したものである。それぞれのオリゴヌクレオチドはそれぞれ異なる遺伝子に対応している。測定に際しては、メッセンジャーＲＮＡを鋳型として逆転写酵素反応を行い、相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）断片を合成する。

その逆転写酵素反応の際に、適当な標識物質を結合ないしは鎖伸長時に取り込ませることで、ｃＤＮＡ断片を標識化する（以後、標識されたｃＤＮＡを、標識化ｃＤＮＡと呼ぶ）。基板上に固定化されたオリゴヌクレオチドは、標識化ｃＤＮＡ断片と相補結合する。オリゴヌクレオチドは基板上の異なる座標値に固定化されている。予めどの座標値にどのオリゴヌクレオチドが固定化されているかが分かれば、複数の遺伝子のそれぞれについてメッセンジャーＲＮＡの増減を、同時測定することができる。

本発明者らは、オリゴヌクレオチドアレイを用いて、ストレスの程度を評価するという目標を達成するために検討した結果、（１）校正用内部・外部標準遺伝子、（２）熱ショック蛋白質（Ｈｅａｔ　Ｓｈｏｃｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎ，以後ＨＳＰと記載する）などのストレス耐性遺伝子とストレスにより減少する性ホルモンなどのホルモン遺伝子、（３）免疫応答・炎症反応を誘導するサイトカイン遺伝子、（４）細胞死を誘導する機能を有する遺伝子、（５）グルココルチコイド、ＴＧＦβ、ＦＧＦなどの抗炎症、創傷治癒に関与する遺伝子や増殖抑制遺伝子、（６）免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子、（７）細胞障害を引き起こすサイトカインの誘導にかかわる転写因子やシグナル分子、（８）増殖抑制にかかわる転写因子やシグナル分子、（９）ストレス耐性にかかわる転写因子やシグナル分子などの遺伝子を数多く、少なくとも３０種類以上、より好ましくは数百種類のＤＮＡ断片（オリゴヌクレオチド断片；プローブＤＮＡ）として、同一アレイ上に載せることが必要であることを見いだした。なお前述の（１）から（５）は生体内で特定の機能を司る機能遺伝子、（６）から（９）は機能遺伝子間のシグナル伝達を司るシグナル伝達遺伝子である。

さらに、プローブＤＮＡを基板上に固定化する際の配置を、前記（１）から（９）の遺伝子分類に基づいて行うことで、ＤＮＡアレイの測定結果を、測定者が瞬時に理解し判定できることを見出した。また、メッセンジャーＲＮＡの被検査者からの取得が比較的容易な、白血球（Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ）を検査の際に検体として用いることで、簡便なストレスの程度の評価が可能であることを見出し、本発明の完成に至った。以下、具体的な課題の解決手段を説明する。

本発明は、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを、支持体上の既知の異

なる位置に固定化したアレイであって、前記（１）から（９）の遺伝子の、あるいは前記遺伝子の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイである。

また、本発明は、ストレス反応において協調関係にあることが明らかな内分泌系、免疫系、神経系の3者を相互に関連づける仲介因子群と関連する遺伝子の、あるいは相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイである。前述の仲介因子の例として、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（Ｃｏｒｔｉｃｏｔｒｏｐｉｎ　Ｒｅｌｅａｓｉｎｇ　Ｈｏｒｍｏｎｅ；ＣＲＨ）、サイトカインなどがある。

また、本発明は、同一の支持体上に固定化したオリゴヌクレオチドが、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有し、かつ、２つ以上の異なる信号伝達経路に関連する遺伝子群あるいは前記遺伝子群の相補鎖群からなり、前記遺伝子群が同一の信号伝達経路上にある、細胞膜上受容体あるいは核内受容体と転写因子との間に介在する細胞内信号伝達関連タンパク質群をコードする少なくとも２種類以上の遺伝子からなることを特徴とするオリゴヌクレオチドアレイである。

また、本発明は、塩基配列の異なる複数のオリゴヌクレオチドを支持体上に固定化した第一のオリゴヌクレオチドアレイを用いて、網羅的に遺伝子発現解析を行うことで発現量に変化が見られる遺伝子群及び前記遺伝子群と関連する遺伝子群を選定し、前記遺伝子群及び前記関連遺伝子群の、あるいは前記遺伝子群及び前記関連遺伝子群の相補配列鎖の、少なくとも２０塩基以上の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを支持体上に固定化した第二のオリゴヌクレオチドアレイを作製し、前記第二のオリゴヌクレオチドアレイを用いて遺伝子発現解析を行う遺伝子発現解析方法である。

ストレスの程度を評価するためには、ストレス応答の作用機序を高精度に解析する必要があるため、１種類の遺伝子とのみ相補的結合するはずのＤＮＡ断片が、他遺伝子とも結合すること（クロスハイブリダイゼーション）は避けなくてはならないことは自明である。これは１枚のアレイ上に固定化する遺伝子数が多くなるほど困難になる。従って、遺伝子数が５千から数万という探索用途のＤＮＡア

レイで各遺伝子間のクロスハイブリダイゼーションを皆無にすることは非常に困難である。ブラストアルゴリズムに基づく配列相同性の検討の結果、プローブとして用いるＤＮＡ断片の塩基長が１０００塩基以下である場合、１０００－１５００種類以下のＤＮＡ断片を同一アレイ上に載せることが好ましいことが判明した。そのため、ＤＮＡアレイを使用する目的がストレス応答の作用機序の解明であれば、ストレス応答の作用機序に関連する遺伝子のみを可能なかぎり必要最小限集め、アレイ化することが望ましい。ストレス反応と無関係の遺伝子を載せることは、プローブ作成費用の上昇、ひいてはオリゴヌクレオチドアレイの価格上昇につながり好ましくない。また、アレイのプローブとして用いるオリゴヌクレオチドの種類の数を少なく抑えることができることから、１つの種類のオリゴヌクレオチドを複数箇所にプローブとして固定することができ、複数箇所の信号強度を平均化することで信頼性を高めることができる。

さてストレスがどのような影響を生体に及ぼすかについては、神経系、免疫系、内分泌系に関連する数多くの遺伝子が関与すると考えられるが、その詳細は明らかでなかった。そこで、数多くの遺伝子/ＥＳＴをプローブとするアレイを作り、ストレスによる遺伝子発現プロファイルの変化をヒト末梢血サンプルについて調べ、ストレス負荷量の増加とともに発現量が大きく変化する遺伝子をリストアップすることとした。アレイのプローブとして１５０００種類の遺伝子/ＥＳＴをＩＭＡＧＥ　Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍより購入しスクリーニング用ＤＮＡプローブアレイを作製した。代表的なストレス刺激として、運動ストレスと胃潰瘍ストレスを選択した。

運動ストレスについては、被検査者が自転車エルゴメーターを用いて、個人の最大酸素摂取量（VO_{2MAX}、単位時間あたりに血中に摂取できる酸素の最大値）を１００％とした場合の相対値で８０％（８０％VO_{2MAX}）程度の負荷を６０分継続して与えた。実測された被検査者の場合、この８０％VO_{2MAX}は、自転車エルゴメーター強度で、約１８０ワットに相当した。運動時の脈拍数は、１５０～１７５拍／分であった。なお乳酸性作業閾値（ＬＴ；ｌａｃｔａｔｅ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）は約６０％VO_{2MAX}、心拍数で１１０～１３０拍／分付近に相当するので、８０％VO_{2MAX}で６０分という運動負荷は、運動ス

トレスを負荷する場合に十分な強度を有すると考えられた。運動終了から５分以内に末梢血を５０ｃｃ採血し、白血球からメッセンジャーＲＮＡを抽出して、所定の方法により逆転写反応を行いｃＤＮＡ合成した。逆転写反応の際、蛍光色素Ｃｙ－５で標識されたｄＣＴＰを用いて蛍光標識したｃＤＮＡを合成した（標識化ｃＤＮＡ：運動ストレス負荷）。一方、運動ストレス負荷前に、予め同一被検査者から、末梢血を５０ｃｃ採血しておき、同一手順によりメッセンジャーＲＮＡを抽出し、Ｃｙ－３で標識されたｄＣＴＰを用いて逆転写反応を行いｃＤＮＡ合成した（標識化ｃＤＮＡ：コントロール）。

運動ストレス負荷とコントロールのそれぞれの標識化ｃＤＮＡを等量混合し、前記スクリーニング用ＤＮＡプローブアレイにかけて所定の条件下でハイブリダイゼーションを行い、洗浄後レーザースキャナで各スポットの蛍光強度を測定して、運動ストレス負荷とコントロール間の発現遺伝子の種類、量を評価した。両者の発現量を比較して２倍以上その発現量が変化した遺伝子を、表１に示した。なお、表1に示した発現量の増加量は、種々の刺激を加えても発現量が一定していると考えられるβアクチン、ＨＰＲＴ，ＧＡＰＤＨなどのハウスキーピング遺伝子の発現量が一定であるとして規格化している。

【０００５】

【表１】

表１

GenkBank	遺伝子名
M14758	P-glycoprotein (PGY1) mRNA (MDR1)
M25647	vasopressin mRNA; Arginine vasopressin
NM_000707	arginine vasopressin receptor 1B
Z11687	antidiuretic hormone receptor
NM_001402	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
U83981	Homo sapiens apoptosis associated protein (GADD34)
NM_006582	glucocorticoid modulatory element binding protein 1
AB034989	KIAA0025 gene product
M69177	Human monoamine oxidase B
J04027	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1
NM_002415	macrophage migration inhibitory factor
NM_000261	Homo sapiens myocilin
M14584	Human interleukin 6 mRNA
NM_001078	Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1
NM_005345	heat shock 70kD protein 1
M58603	Human nuclear factor kappa-B DNA binding subunit p105
M34664	Heat shock 60kD protein 1
AF028832	Heat shock 90kD protein 1, alpha

運動ストレスにより、バゾプレッシン（ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ、ａｒｇｉｎｉｎｅ　ｖａｓｏｐｒｅｓｓｉｎ）などの視床下部－下垂体後葉系のホルモン関連遺伝子、副腎皮質刺激ホルモン（ａｄｒｅｎｏｃｏｒｔｉｃｏｔｒｏｐｉｃ　ｈｏｒｍｏｎｅ：ＡＣＴＨ）受容体遺伝子、グルココルチコイド（ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄｓ；Ｃｏｒｔｉｓｏｌ）関連遺伝子の発現量増加が見られた。また、モノアミンオキシダーゼ（ｍｏｎｏａｍｉｎｅ　ｏｘｉｄａｓｅ）などのカテコールアミン関連遺伝子の発現量増加が見られた。また、インターロイキン６（ＩＬ６）などのサイトカイン遺伝子、ＮＦ－κＢなどの転写因子、熱ショック蛋白質（Ｈｅａｔ　Ｓｈｏｃｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）の一種であるＨＳＰ７０、ＨＳＰ９０の発現増加も観察された。加えて、Ca^{2+}ＡＴＰａｓｅの減少といったプロトンポンプ遺伝子の変化、ＧＡＤＤ３４といったアポトーシス関連遺伝子

の発現増加が見られた。

胃潰瘍ストレスについては、胃潰瘍の患者から採取した末梢血５０ｃｃからメッセンジャーＲＮＡを抽出して、所定の方法により逆転写反応を行いｃＤＮＡ合成した。逆転写反応の際、蛍光色素Ｃｙ－５で標識されたｄＣＴＰを用いて蛍光標識したｃＤＮＡを合成した（標識化ｃＤＮＡ：胃潰瘍ストレス）。一方、胃潰瘍を罹患していない健常な被検査者から、末梢血を５０ｃｃ採血し、同一手順によりメッセンジャーＲＮＡを抽出し、Ｃｙ－３で標識されたｄＣＴＰを用いて逆転写反応を行いｃＤＮＡ合成した（標識化ｃＤＮＡ：コントロール）。

胃潰瘍ストレスとコントロールのそれぞれの標識化ｃＤＮＡを等量混合し、前記スクリーニング用ＤＮＡプローブアレイにかけて所定の条件下でハイブリダイゼーションを行い、洗浄後レーザースキャナで各スポットの蛍光強度を測定して、胃潰瘍ストレスとコントロール間の発現遺伝子の種類、量を評価した。両者の発現量を比較して２倍以上その発現量が変化した遺伝子を、表２に示した。なお、表２に示した発現量の増加量は、種々の刺激を加えても発現量が一定していると考えられるβアクチン、ＨＰＲＴ，ＧＡＰＤＨなどのハウスキーピング遺伝子の発現量が一定であるとして規格化している。

【０００６】

【表２】

表２

GenkBank	遺伝子名
AF022224	Bcl-2-binding protein
NM_004244	CD163 antigen
U82812	scavenger receptor cysteine rich Sp alpha
U47741	CREB-binding protein
X58022	corticotropin-releasing factor binding protein
NM_001402	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
NM_000862	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1
NM_002228	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog (JUN) mRNA
M14584	Human interleukin 6 mRNA
X79483	ERK6 mRNA for extracellular signal regulated kinase
NM_000529	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)
NM_001043	solute carrier family 6 member 2 (SLC6A2)
M59979	prostaglandin G/H synthase 1 precursor
X54079	Heat shock 27kD protein 1
D90224	glycoprotein 34 (gp34)
NM_005345	heat shock 70kD protein 1
AF028832	Heat shock 90kD protein 1, alpha

胃潰瘍ストレスにより、ＣＲＨなどの視床下部－下垂体前葉系のホルモン関連遺伝子、ＡＣＴＨ、グルココルチコイド関連遺伝子の発現量増加が見られた。その一方、バソプレッシンなどの視床下部－下垂体後葉系の発現量の変化はあまり見られなかった。そして、運動ストレスと同様にＩＬ６などのサイトカイン遺伝子、熱ショック蛋白質の一種であるＨＳＰ７０、ＨＳＰ９０の発現増加も観察された。また、信号伝達遺伝子であるＥＲＫ６や転写因子であるＪＵＮの発現増加が見られた。そしてプロスタグランジンといった抗炎症関連遺伝子の発現増加も見られた。

運動ストレスと胃潰瘍ストレスのいずれかにおいて、２倍以上発現量が変化した遺伝子の中に視床下部－下垂体系ホルモン（ＣＲＨ、バソプレッシン、オキシトシン）や、副腎皮質刺激ホルモン（ＡＣＴＨ）や副腎皮質ホルモン（グルココルチコイド）の関連遺伝子が含まれているのは、視床下部が興奮した結果、下垂体、副腎皮質などが活性化されたことを反映している。この視床下部－下垂体－副腎皮質系（Ｈｙｐｏｔｈａｌａｍｉｃ　Ｐｉｔｕｉｔａｒｙ　Ａｄｒｅｎｏｃｏ

ｒｔｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍ）を以後、ＨＰＡ系とよぶ。またカテコールアミン関連の遺伝子が含まれているのは、視床下部－交感神経－副腎髄質系（Ｓｙｍｐａｔｈｅｔｉｃ　Ａｄｒｅｎｏｍｅｄｕｌｌａｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ：以後、ＳＡＭ系とよぶ）が活性化されたことを反映している。更に、これらＨＰＡ系、ＳＡＭ系の内分泌系により産生されたホルモンが血液中に分泌され、血球上のホルモン受容体と結合することにより、Ｇ蛋白質やアデニレートシクレース、ＮＦ－κＢなどといった、細胞内の信号伝達関連遺伝子の発現増加が生じ、最終的にサイトカイン遺伝子の発現が起こったと理解される。そして、細胞レベルのストレス反応の一環として、熱ショック蛋白質などのストレス蛋白質発現量の増加が起こったと理解される。また副腎皮質ホルモン（グルココルチコイド）によりグルココルチコイド受容体が活性化したことで、カルシウム経路のアポトーシスが誘導されたと理解される。まったく異なる２つのストレス刺激において、類似の遺伝子群の発現が変化したことは、これら一群の遺伝子発現強度の変化を観察すれば、複雑系であるストレス反応を解析する際に有用であることを示唆する。

すなわち、ストレスの程度を解析するには、（１）校正用内部・外部標準遺伝子、（２）ＨＳＰなどのストレス耐性・生存に関与する遺伝子とホルモン遺伝子、（３）サイトカイン遺伝子、（４）細胞死を誘導する機能を有する遺伝子、（５）グルココルチコイドなどの抗炎症に関与する遺伝子や増殖抑制遺伝子、（６）免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子、（７）細胞障害を引き起こすサイトカインの誘導にかかわる転写因子やシグナル分子、（８）増殖抑制にかかわる転写因子やシグナル分子、（９）ストレス耐性にかかわる転写因子やシグナル分子などの遺伝子を、それぞれ必要最小限、固定化したＤＮＡアレイが最も適している。

また前記（１）から（９）の分類ごとに支持体上のプローブ固定化領域を分けることで、測定者が目視により測定結果をパターン認識できる。もしプローブ固定化領域を遺伝子の機能ごとに分けなければ、蛍光信号取得後に、コンピュータ等を用いたスポットの並び替え、数値プロット、グラフ表示などの結果表示工程が必要となる。それに対して、予めプローブ遺伝子をその機能により分類しその分類に従って基板上に配置しておくことで、蛍光信号を取得してそのまま画面表示

することのみにより、測定者は瞬時にストレスの程度を判定できるので、装置構成の単純化、低コスト化をより容易に達成できる。

校正作業は、例えば複数のアレイを作成した際の製造ばらつきをなくすために必要である。校正用のオリゴヌクレオチドを、校正用内部・外部標準遺伝子と呼ぶ。校正用内部標準遺伝子とは、例えばハウスキーピング遺伝子のことである。ハウスキーピング遺伝子は、細胞の生存に必要な構成タンパク質やエネルギー代謝系の酵素などをコードしている遺伝子であり、分化の異なるどのような細胞でも発現していると考えられる遺伝子である。例えば、βアクチン、ＧＡＰＤＨ、ＨＰＲＴ、αチューブリン、トランスフェリン受容体、ユビキチンなどである。白血球等の被検査者サンプルに予め含まれているので、校正の際、内部標準となる。なお内部標準とは、外部から加えなくても予めサンプル中に存在しており、校正の際に標準となるものである。校正用外部標準遺伝子とは例えば、ヒトには存在しない、植物、微生物、昆虫などの遺伝子配列のことである。例えばシロイヌナズナ遺伝子、プラスミドＤＮＡ、バクテリオファージＤＮＡ、ファイアフライルシフェラーゼ（Ｆｉｒｅｆｌｙ　ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ）遺伝子などである。白血球等の被検査者サンプルには含まれていないので、測定時に外部から、既知濃度の外部標準遺伝子を加えることで、校正の際、外部標準となる。なお外部標準とは、予めサンプル中に存在していないので、外部から別途加えることで校正の際に標準となるものである。

ストレス耐性遺伝子は、熱ショックなどの物理的、環境的要因によるストレス負荷時に誘導されてくるタンパク質である。例えば、ストレス蛋白質の一種であるＨＳＰは細胞を高温にさらすことで発現される。このＨＳＰは、高温暴露という外部刺激だけでなく、細胞に変性蛋白質を直接注入する方法によっても発現増加する（Ａｎａｔｈａｎ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ａｂｎｏｒｍａｌ　ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｓｅｒｖｅｓ　ａｓ　ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ　ｓｔｒｅｓｓ　ｓｉｇｎａｌｓ　ａｎｄ　ｔｒｉｇｇｅｒ　ｔｈｅ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｈｅａｔ　ｓｈｏｃｋ　ｇｅｎｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３２，２５２－２５４，１９８６）。つまりＨＳＰは神経系、内分泌系、免疫系などの生体システムによらず細胞内に生じる変化により発現する蛋白質である。またＨＳＰの一種、ＨＳＰ７０は

プログラム細胞死とよばれるアポトーシスを抑制する働きを有することが知られている（Ｍｏｓｓｅｒ，Ｄ．Ｄ．Ｒｏｌｅ ｏｆ ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ｈｅａｔ ｓｈｏｃｋ ｐｒｏｔｅｉｎ ｈｓｐ７０ ｉｎ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ａｇａｉｎｓｔ ｓｔｒｅｓｓ－ｉｎｄｕｃｅｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，１７，５３１７－５３２７，１９９７）。アポトーシスはウイルス感染、酸化ストレス、放射線、抗がん剤などにさらされた細胞で出現する細胞死の形態である。過剰なストレスが細胞にかかることでアポトーシスが誘導されるが、ＨＳＰ７０は細胞にストレス耐性を持たせ、細胞死を抑制する働きがある。ＨＳＰが発現した細胞では、引き続き直接の原因となったストレスに加え、他のストレスに対しても抵抗性を示す（交叉抵抗性）ことから、ＨＳＰは細胞自体が有するストレス反応処理機構であると考えられる。細胞レベルのストレスの程度を評価するにはストレス蛋白質の発現増加、発現抑制の程度を知ることが極めて有用である。ストレス蛋白質だけでも３０種類以上が知られているので、本発明のオリゴヌクレオチドアレイでも、少なくともストレスタンパク質を含め、オリゴプローブを約３０種類以上固定化することが望ましい。ストレスタンパク質には、例えばＨＳＰ２７（Ｓｍａｌｌ ＨＳＰ）、ＨＳＰ４０（Ｈｄｊ１）、ＨＳＰ４７、ＨＳＰ６０／ＨＳＰ１０，ＨＳＣ７０、ＨＳＰ７０．ｍｔＨＳＰ７０、ＨＳＰ９０．ＨＳＰ１００（ＧＲＰ９５）、ＨＳＰ１５０（ＯＲＰ１５０）、Ｂｉｐ（ＧＲＰ７８）．ＴＲｉＣなどがある。

細胞の生存に関与する遺伝子は、ストレスタンパク質のほかに、例えば細胞周期の調節を司るサイクリン(ｃｙｃｌｉｎ)とサイクリン依存性キナーゼ（ＣＤＫ、Ｃｙｃｌｉｎ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｋｉｎａｓｅ）、ＣＤＫ阻害因子(ＣＫＩ，ＣＤＫ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ)、例えばサイクリンＡ，サイクリンＢ，サイクリンＤ，サイクリンＥ、ＣＤＫ１、ＣＤＫ２、ＣＤＫ４、ＣＤＫ６、などが挙げられる。

ホルモンとは内分泌腺などで産生され、血液中に分泌されて標的器官まで運ばれ、微量でも特異的な生理作用を発揮する有機化合物を意味する。代表的な内分泌系として（ａ）ＨＰＡ系、（ｂ）ＳＡＭ系、（ｃ）自律神経－膵内分泌系、（ｄ）視床下部－交感神経－レニン・アンギオテンシン系、（ｅ）視床下部－下垂体

後葉系、（ｆ）オピオイドペプチド系がある。ホルモン関連遺伝子は、例えば、バソプレッシン（ＡＶＰ）、バソプレッシン受容体（ＡＶＰＲ）、ＣＲＨ，ＣＲＨ受容体（ＣＲＨＲ）、ＭＣ２Ｒ、ＲＥＮ、ＴＨ、ＴＳＨＢ，ＴＳＨＲなどがある。

サイトカイン（ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ）は血球細胞が細胞の増殖と分化を誘導する因子として分泌する生理活性ペプチドの総称である。サイトカインはホルモンと比較して分泌された近傍で働く点、その血中濃度はホルモンに匹敵するかもしくはそれ以下の低濃度である点が異なる。主なサイトカインとして、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ，ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ－ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ，ｍａｃｒｏｈａｇｅ－ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ，ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ）、エリスロポエチン（ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ）、トロンボポエチン（ｔｈｒｏｍｂｏｐｏｉｅｔｉｎ）、幹細胞因子（ＳＣＦ，ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｆａｃｔｏｒ）、インターロイキン（ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ）１，２，３，４，５，６，７，８，９，１０，１１，１２、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ，ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ）、インターフェロン（ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ）が挙げられる。

ストレスにより細胞死を誘導する機能を有する遺伝子のほとんどはアポトーシス関連遺伝子であると考えられる。なぜなら生体においておこる細胞死はほとんどがアポトーシスと呼ばれる細胞死であるためである。アポトーシスの起こる経路には、カルシウム経路、死のシグナル経路、セラミド経路、ミトコンドリア経路、ＤＮＡ障害経路がある。カルシウム経路は、ホスファジルイノシトール３リン酸レセプター、カルモジュリン、ＡＬＧ２，カルパインなどの遺伝子が関与する。死のシグナル経路は、ＴＮＦα、Ｆａｓリガンド、ＴＲＡＤＤ，ＦＡＤＤ，ＲＡＩＤＤ ＦＡＤＤ，ＲＩＰ，ＲＡＩＤＤ、ＣＡＳＰ８，ＣＡＳＰ１、ＣＡＳＰ３、ＴＲＡＭＰ，ＴＲＡＩＬなどが関与していることが知られている。セラミド経路には、ＳＡＰＫ（ｓｔｒｅｓｓ－ａｃｉｖａｔｅｄ ｐｒｏｔ

ｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ）／ＪＮＫ（Ｊｕｎ ｔｅｒｍｉｎａｌ－Ｎ ｋｉｎａｓｅ）が関与している。ミトコンドリア経路は、Ｂａｘ２（Ｂｃｌ－２ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｘ ｐｒｏｔｅｉｎ）、Ｂｃｌ－２，Ｂｃｌ－ｘＬ、カスパーゼ遺伝子が関与している。ＤＮＡ障害経路では、ｐ５３、ｐ２１、ｐ５１、ｐ７３、ＭＤＭ２遺伝子等が関与している。

グルココルチコイドなどの抗炎症に関与する遺伝子や増殖抑制遺伝子として、シトクロムＰ４５０遺伝子１１Ｂ１（ＣＹＰ１１Ｂ１）、ＣＹＰ１１Ｂ２，ＣＹＰ１７，ＣＹＰ２１Ａ２、グルココルチコイド調節因子結合タンパク質（ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄ ｍｏｄｕｌａｔｏｒｙ ｅｌｅｍｅｎｔ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ；ＧＭＥＢ）、グルココルチコイド抑制因子（ｇｌｕｃｏｃｏｒｔｉｃｏｉｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ；ＧＲＬＦ）、ミオシリン（ｍｙｏｃｉｌｉｎ：ＭＹＯＣ）、グルココルチコイド受容体α（ＮＲ３Ｃ１）、プロオピオメラノコルチン（ｐｒｏｏｐｉｏｍｅｌａｎｏｃｏｒｔｉｎ；ＰＯＭＣ）、プロスタグランジン（ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｇ/Ｈ ｓｙｎｔｈａｓｅ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ）などがある。

免疫応答、サイトカイン誘導、増殖抑制、ストレス耐性に関与する転写因子やシグナル分子には例えば、ＡＴＦ／ＣＲＥＢ転写因子、ＮＦκＢ転写因子、ＪＵＮ遺伝子、１４－３－３ｎ遺伝子などがある。また多くの信号伝達では、タンパク質がリン酸化という化学的な変化を受けることで活性化し、これが隣接する別のタンパク質をリン酸化するという反応が次々とおこることで信号が伝わっていくという機構が一般的である。信号伝達経路をパスウエイと呼び、経路上の代表的なタンパク質の名前を付けて区別することが一般的である（命名方法はｗｗｗ．ｂｉｏｃａｒｔａ．ｃｏｍを参照した）。たとえば、ＭＡＰＫ（ｍｉｔｏｇｅｎ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ）、ＡＴＭ（ａｔａｘｉａ ｔｅｌａｎｇｉｅｃｔａｓｉａ ｍｕｔａｔｅｄ）、ＢＣＲ（Ｂ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ）、ＣＤ４０（腫瘍壊死因子受容体関連）、ＣＸＣＲ４（ケモカイン受容体関連）、ＥＧＦ（ｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）、ＥＰＯ（ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｉｅｔｉｎ）、ＦＡＳ（ｆａｔｔｙ－ａｃｙｌ－ＣｏＡ ｓｙｎｔｈａｓｅ）、ＦｃＥｐｓｉｌｏｎ（Ｆｃ ｆｒａｇ

ment of IgE receptor)、IFN(interferon) alpha、IFN(interferon) gamma、IGF－1(insulin－like growth factor－1)、IL(interleukin)－2、－3、－4、－5、－6、－18、NFκB(nuclear factor κB)、NGF(nerve growth factor)、p53、PDGF(platelet derived growth factor)、PLC(phospholipase C)、SODD(silencer of death domains)、TCR(T cell receptor)、TGFβ(transforming growth factor β)、TNFR1(tumor necrosis factor receptor 1)、TNFR2(tumor necrosis factor receptor 2)、TPO(thrombopoietin)、Wnt(wingless／int－1)が知られている(たとえばwww.biocarta.com)。これらのパスウエイ上のキーとなるタンパク質をコードする遺伝子をアレイ上にプローブとして載せることにより、ストレス刺激により誘導される信号伝達経路を同定することができる。特に、信号伝達経路上の１つのタンパク質機能に障害があることが原因で慢性ストレス症候群に罹患している場合には、信号伝達がどこで中断したのかを明らかにすることで、治療方針を決定することができる。

上記の遺伝子の配列を持つオリゴヌクレオチドをプローブとしてアレイ上に載せるためには、遺伝子配列のどの部分の配列をプローブとするかを決める必要がある。その際考慮しなければならないのが、融解温度(Tm，melting temperature)とクロスハイブリダイゼーションである。DNAアレイ上に固定化された各DNA断片と試料由来DNA断片間での、ハイブリダーゼーションを高精度（ないしは高ストリンジェント、highly stringent）に行うためには、ハイブリダイゼーション温度(Th，hybridization temperature)と固定化DNA断片のTmの関係が重要であり、固定化DNA断片の融解温度とハイブリダイゼーション温度との差異が３０℃を超えないことが必要である。また、クロスハイブリダイゼーションは、

ＤＮＡ配列同士のホモロジーが高いために生じるので、クロスハイブリダイゼーションを防ぐためには、固定化ＤＮＡ断片と、試料由来のＤＮＡ断片のうち固定化ＤＮＡ断片と本来ハイブリダイズしないＤＮＡ断片との相同性が十分低いことが必要である。さらには、ミニヘアピン構造をとるような配列や、ヒト遺伝子の場合にＡｌｕ配列として知られているような繰り返し配列と相同性が有意に高い部分が含まれないことが望ましい。また、１枚のアレイ上に固定化する遺伝子配列同士のホモロジーを計算するのみならず、ＤＮＡ配列とＧＥＮＢＡＮＫ等の対象となる生物種の遺伝子配列とのホモロジーを計算する必要もある。ＤＮＡアレイ上に固定化するＤＮＡ断片候補の配列と、測定対象試料に含まれている可能性のある遺伝子群のＤＮＡ配列とを比較して、ホモロジーが有意に高いＤＮＡ配列は、固定化ＤＮＡ断片としては選択しないことが望ましい。

プローブとして固定化するＤＮＡ断片は、市販のｃＤＮＡライブラリをテンプレートしてＰＣＲ反応により合成することができる。これを所定の濃度（０．１－１．０μg/μl）になるよう調整し、スポッターを用いて、あらかじめポリリジンあるいはアミノシランをコートしたスライドガラス上にスポットすることでオリゴヌクレオチドアレイを作製できる。

上記オリゴヌクレオチドアレイを用いてストレスの程度を調べるには、以下の手順で行うことができる。まず予め、ストレス症状が見られないボランティア数名のおのおのから末梢血を採取し、白血球細胞からメッセンジャーＲＮＡを抽出する。例えば、複数名のメッセンジャーＲＮＡを混合することで、健常人の平均的なメッセンジャーＲＮＡのプールができる。このメッセンジャーＲＮＡのプールのことを、本願明細書の以下の記述では、ユニバーサルコントロール（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｃｏｎｔｒｏｌ）と記載する。次に被検査者の末梢血を採血し、白血球細胞からメッセンジャーＲＮＡを抽出する。オリゴｄＴプライマーを用いた逆転写反応により被検査者末梢血のメッセンジャーＲＮＡについては、Ｃｙ５－ｄＣＴＰを用いて標識化ｃＤＮＡを合成する。またユニバーサルコントロールのメッセンジャーＲＮＡについては、Ｃｙ３－ｄＣＴＰを用いて標識化ｃＤＮＡを合成する。被検査者ｃＤＮＡ（Ｃｙ５標識）とユニバーサルコントロールｃＤＮＡ（Ｃｙ３標識）を混合して同一の前記オリゴヌクレオチドアレイにかけ、所定

の温度、時間の間ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション温度は４５－７０℃、ハイブリダイゼーション時間は６－１８時間が好ましい。ハイブリダイゼーション後、蛍光スキャナーにより各遺伝子をスポットした箇所のＣｙ５とＣｙ３のそれぞれの蛍光強度を比較し、両者での発現量の差を求めることができる。なお、白血球のなかで３～７％を占める単球のみからメッセンジャーＲＮＡを取り出すか、もしくは白血球のなかで２５～３３％を占めるリンパ球のみからメッセンジャーＲＮＡを取り出すことで、よりストレスの程度を反映した解析ができると期待される。なぜなら単球はマクロファージという自然免疫系の重要細胞へ、リンパ球はＴ細胞、Ｂ細胞という獲得免疫系の重要細胞へと分化する能力を有するためである。さらに、これらの白血球は、骨髄での成熟、末梢血での滞留時間、寿命などの細胞回転（動態）が異なるため、多形核白血球（好中球；Neutrophil）を用いた急性期の生体応答、単球を用いた短期間の反応、および、リンパ球を用いた比較的長期間の生体応答を区別して評価できる可能性がある。

【０００７】

【発明の実施の形態】

本発明の実施の形態について、本発明を用いて、1被検査者の日常生活におけるストレスの程度の変化を調べた例を記す。（１）校正用内部・外部遺伝子、（２）ＨＳＰなどのストレス耐性・生存に関与する遺伝子とホルモン遺伝子、（３）サイトカイン遺伝子、（４）細胞死を誘導する機能を有する遺伝子、（５）グルココルチコイドなどの抗炎症に関与する遺伝子や増殖抑制遺伝子、（６）免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子、（７）細胞障害を引き起こすサイトカインの誘導にかかわる転写因子やシグナル分子、（８）増殖抑制にかかわる転写因子やシグナル分子、（９）ストレス耐性にかかわる転写因子やシグナル分子などをコードする７９３種類の遺伝子（表３乃至表３８）を、前章「課題を解決するための手段」に記載した根拠にもとづき、キーワード検索などで、ＧＥＮＢＡＮＫ、ＵｎｉＧｅｎｅより選定した。

【０００８】

【表３】

表３

M14758	Homo sapiens P-glycoprotein (PGY1) mRNA (MDR1)
M14752	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
NM_000789	Homo sapiens dipeptidyl carboxypeptidase 1 (angiotensin I converting enzyme) (ACE)
X00351	cytoplasmic beta-actin (ACTB)
L17075	Human TGF-b superfamily receptor type I mRNA; activin receptor-like kinase 1 (ACVRL1; ALK1)
U92649	Homo sapiens snake venom-like protease (cSVP) mRNA, A disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)
L05500	Homo sapiens adenylate cyclase 1 (ADCY1); Human fetal brain adenylyl cyclase mRNA, 3' end
AF070583	Homo sapiens clone 24648 adenylyl cyclase mRNA, partial cds
NM_004036	Homo sapiens adenylate cyclase 3 (ADCY3)
AF250226	Homo sapiens adenylyl cyclase type VI mRNA
NM_001114	Homo sapiens adenylate cyclase 7 (ADCY7)
Z35309	H.sapiens mRNA for adenylyl cyclase
NM_001116	Homo sapiens adenylate cyclase 9 (ADCY9)
NM_001117	Homo sapiens adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) (ADCYAP1)
NM_001118	Homo sapiens adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I (ADCYAP1R1)
M18112	Human poly(ADP-ribose) polymerase mRNA (ADPRT), PARP
M87290	Human angiotensin II type 1 receptor mRNA
X65699	H.sapiens mRNA for angiotensin II receptor
NM_000686	Homo sapiens angiotensin receptor 2 (AGTR2)
NM_005161	Homo sapiens angiotensin receptor-like 1 (AGTRL1)
NM_005162	Homo sapiens angiotensin receptor-like 2 (AGTRL2)
NM_003488	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 1 (AKAP1)
NM_007202	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 10 (AKAP10)
AB014529	A kinase (PRKA) anchor protein 11 (AKAP11); Homo sapiens mRNA for KIAA0629 protein, partial cds
NM_005100	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12 (AKAP12)
NM_007203	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 2 (AKAP2)
NM_006422	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 3 (AKAP3)
NM_003886	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 4 (AKAP4)
NM_004857	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 5 (AKAP5)

【表４】

表４

NM_004274	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 6 (AKAP6)
NM_016377	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 7 (AKAP7)
NM_005858	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 8 (AKAP8)
NM_005751	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9 (AKAP9)
M63167	Human rac protein kinase alpha mRNA (akt1), complete cds
NM_001283	Homo sapiens AP1S1adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit (AP1S1)
NM_003916	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit (AP1S2)
AF013263	Homo sapiens apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) mRNA, complete cds
M74088	adenomatous polyposis coli protein (APC protein); DP2.5
AB023421	Homo sapiens mRNA for heat shock protein apg-1; Heat shock protein (hsp110 family)
U45879	Human inhibitor of apoptosis protein 2 mRNA; Apoptosis inhibitor 1
U45878	Human inhibitor of apoptosis protein 1 mRNA; Apoptosis inhibitor 2
X06820	H.sapiens rhoB gene mRNA; Ras homolog gene family, member B
L25081	Homo sapiens GTPase (rhoC) mRNA, complete cds; Ras homolog gene family, member C
X95282	H.sapiens mRNA for Rho8 protein; Ras homolog gene family, member E
X61587	H.sapiens rhoG mRNA for GTPase; Ras homolog gene family, member G (rho G)
U02570	Human CDC42 GTPase-activating protein mRNA, partial cds
X78817	H.sapiens partial C1 mRNA; Rho GTPase activating protein 4
U17032	Human p190-B (p190-B) mRNA, complete cds; Rho GTPase activating protein 5
AF177663	Homo sapiens GTPase-activating protein 6 isoform 4 (ARHGAP6) mRNA, alternatively spliced, complete cds; Rho GTPase activating protein 6
NM_015366	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 8 (ARHGAP8), mRNA

【表５】

表５

X69550	H.sapiens mRNA for rho GDP-dissociation Inhibitor 1
L20688	Human GDP-dissociation inhibitor protein (Ly-GDI) mRNA, D4-GDI
U82532	Homo sapiens GDI-dissociation inhibitor RhoGDIgamma mRNA, complete cds; Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma
U64105	Human guanine nucleotide exchange factor p115-RhoGEF mRNA, partial cds; Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
Z35227	H.sapiens TTF mRNA for small G protein; Ras homolog gene family, member H
U96750	Homo sapiens putative tumor supressor NOEY2 mRNA; Ras homolog gene family, member I
NM_005171	Homo sapiens activating transcription factor 1 (ATF1)
M31630	Human cyclic AMP response element-binding protein (HB16) mRNA, 3' end
L19871	Human activating transcription factor 3 (ATF3) mRNA
NM_001675	Homo sapiens activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4)
NM_012068	Homo sapiens activating transcription factor 5 (ATF5)
NM_007348	Homo sapiens activating transcription factor 6 (ATF6)
NM_006856	Homo sapiens activating transcription factor 7 (ATF7)
U33841	Human ataxia telangiectasia (ATM) mRNA
M25647	Human vasopressin mRNA; Arginine vasopressin (neurophysin II, antidiuretic hormone, diabetes insipidus, neurohypophyseal)
L25615	Human arginine vasopressin receptor 1 (AVPR1) mRNA, complete cds
NM_000707	Homo sapiens arginine vasopressin receptor 1B (AVPR1B), mRNA
Z11687	H.sapiens mRNA for antidiuretic hormone receptor; Arginine vasopressin receptor 2 (nephrogenic diabetes insipidus)
AF009674	Homo sapiens axin (AXIN1) ,partial cds
NM_004655	Homo sapiens axin 2 (conductin, axil) (AXIN2), mRNA
U66879	Human Bcl-2 binding component 6 (bbc6) mRNA; BAD protein
AF022224	Homo sapiens Bcl-2-binding protein (BAG-1) mRNA
AF111116	Homo sapiens silencer of death domains (SODD) mRNA; BCL2-associated athanogene 4
NM_017450	Homo sapiens BAI1-associated protein 2 (BAIAP2), transcript variant 1, mRNA
U23765	Human bcl2 homologous antagonist/killer (BAK)
L22474	Human Bax beta mRNA, apoptosis regulator bax
U29680	Human A1 protein; BCL-2-related protein A1 (BCL2A1); BFL1 protein

【表６】

表６

Z23115	H.sapiens bcl-xL mRNA; BCL2-like 1
U59747	Human apoptosis regulator bclw; KIAA0271; BCL2L2
U34584	Human Bcl-2 interacting killer (BIK) ; NBK apoptotic inducer protein; BP4; BIP1
U14680	Human breast and ovarian cancer susceptibility (BRCA1)
X58957	H.sapiens atk mRNA for agammaglobulinaemia tyrosine kinase
Y14153	Homo sapiens mRNA for beta-transducin repeat containing protein (beta-TrCP)
X83703	H.sapiens mRNA for cytokine inducible nuclear protein; Cardiac ankyrin repeat protein
U13699	Human interleukin 1-beta converting enzyme isoform delta (IL1BCE) mRNA
U60519	Human apoptotic cysteine protease Mch4 (Mch4) mRNA, complete cds
U13021	Human positive regulator of programmed cell death ICH-1L (Ich-1) mRNA, complete cds
U13737	Human cysteine protease CPP32 isoform alpha mRNA, complete cds
U28014	Human cysteine protease (ICErel-II) mRNA, complete cds
U28015	Human cysteine protease (ICErel-III) mRNA, complete cds
U20536	Human cysteine protease Mch2 isoform alpha (Mch2) mRNA, complete cds
U37448	Human Mch3 isoform alpha (Mch3) mRNA, complete cds
U60520	Human apoptotic cysteine protease Mch5 isoform alpha (Mch5) mRNA, complete cds
U60521	Human protease proMch6 (Mch6) mRNA, complete cds
U66838	Human cyclin A1 mRNA, complete cds
X51688	Human mRNA for cyclin A; Cyclin A2
M25753	Human cyclin B mRNA, 3' end.; Cyclin B1
AF002822	Human cyclin B2 mRNA, complete cds
M74091	Human cyclin mRNA
M64349	Human G1/S-specific cyclin D1 (CCND1); cyclin PRAD1; bcl-1 oncogene

【表７】

表７

M90813	Human D-type cyclin (CCND2) mRNA, complete cds; cyclin D2
M92287	Homo sapiens cyclin D3 (CCND3) mRNA, complete cds
M73812	Human cyclin E mRNA sequence
U47413	Human cyclin G1 mRNA, complete cds
U47414	Human cyclin G2 mRNA, complete cds
U11791	Human cyclin H mRNA, complete cds
D50310	Human mRNA for cyclin I, complete cds
U28694	Human eosinophil CC chemokine receptor 3 mRNA, complete cds
U54994	Human CC chemokine receptor 5 (CCR5) mRNA, complete cds
NM_004244	Homo sapiens CD163 antigen (CD163)
M14362	Human T-cell surface antigen CD2 (T11) mRNA, complete cds
J02988	Human T-cell-specific homodimer surface protein CD28 mRNA, complete cds
NM_000732	Homo sapiens CD3D antigen, delta polypeptide (TiT3 complex) (CD3D), mRNA
X03884	Human mRNA for T3 epsilon chain (20K) of T-cell receptor (from peripheral blood lymphocytes).
X04145	Human mRNA for T-cell receptor T3 gamma polypeptide, RON alpha
J04132	Human T cell receptor zeta-chain mRNA, complete cds
M12807	Human T-cell surface glycoprotein T4 mRNA, complete cds
M59040	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
U82812	Human scavenger receptor cysteine rich Sp alpha mRNA
M80462	Human MB-1 mRNA; CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)
M89957	Human immunoglobulin superfamily member B cell receptor complex cell surface glycoprotein (IGB) mRNA, CD79B
M27533	CD80 antigen (CD28 antigen ligand 1, B7-1 antigen)
U04343	Human CD86 antigen mRNA, complete cds
M12828	Homo sapiens T-cell surface protein T8 mRNA
M36712	Human T lymphocyte surface glycoprotein (CD8-beta) mRNA, complete cds
S72008	hCDC10=CDC10 homolog [human, fetal lung, mRNA, 2314 nt].
U18291	Human CDC16Hs mRNA, complete cds
X05360	Human CDC2 gene involved in Cell Cycle control; CDK1
M81933	Human cdc25A mRNA, complete cds
M81934	Human cdc25B mRNA, complete cds.
M34065	Human cdc25Hs mRNA, complete cds

【表８】

表８

U00001	Human homologue of S. pombe nuc2+ and A. nidulans bimA; Cell division cycle 27
AF067524	Homo sapiens PITSLRE protein kinase beta SV12 isoform (CDC2L2) mRNA, complete cds
M80629	Human cdc2-related protein kinase (CHED) mRNA; Cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)
L22005	Human ubiquitin conjugating enzyme mRNA, partial cds; Cell division cycle 34
U63131	Human CDC37 homolog mRNA, complete cds
M35543	Human GTP-binding protein (G25K) mRNA, complete cds
AF022109	Homo sapiens HsCdc18p (HsCdc18) mRNA, complete cds
L33264	Homo sapiens CDC2-related protein kinase (PISSLRE) mRNA; Cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10
M68520	Human cdc2-related protein kinase mRNA, complete cds
X66357	H.sapiens mRNA cdk3 for serine/threonine protein kinase
M14505	Human (clone PSK-J3) cyclin-dependent protein kinase mRNA; cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)
X66364	H.sapiens mRNA PSSALRE for serine/threonine protein kinase.
X80343	H.sapiens p35 mRNA for regulatory subunit of cdk5 kinase
U34051	Human cyclin-dependent kinase 5 activator isoform p39i mRNA, complete cds.
X66365	H.sapiens mRNA PLSTIRE for serine/threonine protein kinase
X77743	H.sapiens CDK activating kinase mRNA
X85753	Homo sapiens mRNA for CDK8 protein kinase.
L25676	Homo sapiens CDC2-related kinase (PITALRE) mRNA, complete cds
L25610	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor mRNA; melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1; p21

【表９】

表９

NM_004064	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) (CDKN1B) mRNA
U22398	Human Cdk-inhibitor p57KIP2 (KIP2) mRNA, complete cds
L27211	Human CDK4-inhibitor (p16-INK4) mRNA; cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I; CDKN2); multiple tumor suppressor 1 (MTS1); p16
U17075	Human p14-CDK inhibitor mRNA, complete cds.; p15
AF041248	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN2C) mRNA, complete cds.; p18
U40343	Human CDK inhibitor p19INK4d mRNA, complete cds; p19
NM_005194	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (CEBPB) mRNA; NF-IL6
AF010127	Homo sapiens Casper mRNA; CASP8 and FADD-like apoptosis regulator; I-FLICE
AF016582	checkpoint kinase 1 (CHK1)
AF009225	Homo sapiens IkB kinase alpha subunit (IKK alpha) mRNA, complete cds; IKK1
L29222	Homo sapiens clk1 mRNA; CDC-like kinase 1
L29216	Homo sapiens clk2 mRNA; CDC-like kinase 2
L29220	Homo sapiens clk3 mRNA; CDC-like kinase 3
M58525	Homo sapiens catechol-O-methyltransferase (COMT) mRNA
NM_001873	Homo sapiens carboxypeptidase E (CPE)
Y00816	Complement component (3b/4b) receptor 1, including Knops blood group system; CD35
M26004	Complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2; CD21
U84388	Human death domain containing protein CRADD mRNA; CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
NM_004379	Homo sapiens cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)
U47741	Human CREB-binding protein (CBP) mRNA, complete cds
U47741	Human CREB-binding protein (CBP) mRNA, complete cds
NM_000756	Homo sapiens corticotropin releasing hormone (CRH), mRNA.
X58022	Human mRNA for corticotropin-releasing factor binding protein (CRF-BP).
L23332	Human corticotropin releasing factor receptor mRNA
U34587	Human corticotropin-releasing factor receptor 2 mRNA
U33286	Human chromosome segregation gene homolog CAS mRNA, Chromosome segregation 1 (yeast homolog)-like

【表１０】

表１０

M37435	Human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1) mRNA,complete cds
M10663	Human T-cell granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) mRNA
M73832	Human GM-CSF receptor (GM-CSF receptor) mRNA, complete cds
M59941	Human GM-CSF receptor beta chain mRNA; IL3R-beta
X03438	Human mRNA for granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).
M59818	Human granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR-1) mRNA, complete cds
NM_001317	Homo sapiens chorionic somatomammotropin hormone 1 (placental lactogen) (CSH1) mRNA
V00573	Human mRNA encoding placental lactogen hormone
L37042	Homo sapiens casein kinase I alpha isoform (CSNK1A1) mRNA
M55265	Human casein kinase II alpha subunit mRNA, complete cds.
M55268	Human casein kinase II alpha' subunit mRNA, complete cds
X16312	Human mRNA for phosvitin/casein kinase II beta subunit
M92934	Human connective tissue growth factor (CTGF)
X87838	H.sapiens mRNA for beta-catenin
U96136	Homo sapiens delta-catenin mRNA, complete cds, Arm
L06797	Human (clone L5) orphan G protein-coupled receptor mRNA, complete cds; Chemokine (C-X-C motif), receptor 4 (fusin)
NM_000497	Homo sapiens cytochrome P450, subfamily XIB (steroid 11-beta-hydroxylase), polypeptide 1 (CYP11B1), mRNA.
NM_000498	Homo sapiens cytochrome P450, subfamily XIB (steroid 11-beta-hydroxylase), polypeptide 2 (CYP11B2) mRNA.
M14564	Human cytochrome P450c17 (steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase) mRNA, complete cds.
M17252	Human cytochrome P450c21 mRNA, 3' end
U18321	Human ionizing radiation resistance conferring protein mRNA; Death associated protein 3
X76104	H.sapiens DAP-kinase mRNA
AF015956	Homo sapiens Fas-binding protein Daxx mRNA, complete cds
NM_000787	Dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)

【表１１】

表１１

M76180	Dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
AB029497	Homo sapiens gadd153 mRNA for CHOP alternatively spliced isoform (CASIS)
U91985	Human DNA fragmentation factor-45 mRNA, DFF
AF241254	Homo sapiens angiotensin converting enzyme-like protein mRNA
M60278	Human heparin-binding EGF-like growth factor mRNA (HBEGF); diphtheria toxin receptor (DTR)
X68277	H.sapiens CL 100 mRNA for protein tyrosine phosphatase, Dual specificity phosphatase 1, MKP1
U46461	Human dishevelled homolog (DVL) mRNA, complete cds.
NM_004422	Homo sapiens dishevelled 2 (homologous to Drosophila dsh) (DVL2), mRNA
U49262	Human dishevelled (DVL) mRNA, complete cds
M96577	Homo sapiens (E2F-1) pRB-binding protein mRNA; retinoblastoma-binding protein 3 (RBBP3);
NM_001402	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)
X04571	Human mRNA for kidney epidermal growth factor (EGF) precursor; urogastrone
U01877	Human p300 protein mRNA, complete cds
X02157	Human mRNA for fetal erythropoietin
M60459	Human erythropoietin receptor mRNA, complete cds
U24231	Human Fas-associating death domain-containing protein mRNA
AJ271408	Homo sapiens mRNA for Fas-associated factor, FAF1
X06948	Human mRNA for high affinity IgE receptor alpha-subunit (FcERI); Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
M33195	Human Fc-epsilon-receptor gamma-chain mRNA; Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide
M28696	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)
X51943	acidic fibroblast growth factor (AFGF) + heparin-binding growth factor 1 precursor (HBGF-1);
U67918	Human keratinocyte growth factor 2 mRNA, complete cds
U66199	Human fibroblast growth factor homologous factor 3 (FHF-3) mRNA, complete cds
U66197	Human fibroblast growth factor homologous factor 1 (FHF-1) mRNA, complete cds
U66198	Human fibroblast growth factor homologous factor 2 (FHF-2) mRNA, complete cds

【表１２】

表１２

U66200	Human fibroblast growth factor homologous factor 4 (FHF-4) mRNA, complete cds
M27968	Human basic fibroblast growth factor (FGF) mRNA (BFGF; FGFB; FGF2)
M17446	Human Kaposi's sarcoma oncogene fibroblast growth factor mRNA,complete cds
M37825	Human fibroblast growth factor-5 (FGF-5) mRNA, complete cds
X63454	Human fibroblast growth factor 6 precursor (FGF6); HBGF6; HST2
M60828	Human keratinocyte growth factor mRNA; fibroblast growth factor 7 (FGF-7)
U36223	Human fibroblast growth factor 8 (FGF8); androgen-induced growth factor precursor (AIGF); HBGF8
D14838	Human mRNA for FGF-9
M34641	Human fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 mRNA
M80634	Human keratinocyte growth factor receptor mRNA; fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)
M58051	Human fibroblast growth factor receptor (FGFR3) mRNA
L03840	Human fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) mRNA, complete cds.
Y12863	Homo sapiens mRNA for growth factor FIGF; C-fos induced growth factor (VEGF D)
U01134	Human soluble vascular endothelial cell growth factor receptor (sflt) mRNA; vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1);
U02687	Human growth factor receptor tyrosine kinase (STK-1) mRNA; FLK2
X69878	H.sapiens Flt4 mRNA for transmembrane tyrosine kinase; vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor (VEGFR3)
X16707	Human fra-1 mRNA; FOS-like antigen-1
NM_005479	Homo sapiens frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas (FRAT1) mRNA
NM_000510	Homo sapiens follicle stimulating hormone, beta polypeptide (FSHB)
M65085	Human follicle stimulating hormone receptor mRNA
AB017363	Homo sapiens mRNA for frizzled-1, complete cds
X02492	Human interferon-inducible mRNA fragment (cDNA 6-16).
M32865	Human Ku protein subunit mRNA; Thyroid autoantigen 70kD (Ku antigen)
U83981	Homo sapiens apoptosis associated protein (GADD34) mRNA
M60974	Human growth arrest and DNA-damage-inducible protein (gadd45) mRNA

【表１３】

表１３

NM_015675	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, beta (GADD45B)
NM_006705	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma (GADD45G)
X01677	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
NM_000805	Homo sapiens gastrin (GAS)
J04040	Human glucagon mRNA, complete cds
L20316	Human glucagon receptor mRNA
NM_000515	Homo sapiens growth hormone 1 (GH1)
M38451	Human placenta-specific growth hormone mRNA
NM_000163	Homo sapiens growth hormone receptor (GHR)
NM_000823	Homo sapiens growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR)
NM_004122	Homo sapiens growth hormone secretagogue receptor (GHSR)
NM_006582	Homo sapiens glucocorticoid modulatory element binding protein 1 (GMEB1)
NM_012384	Homo sapiens glucocorticoid modulatory element binding protein 2 (GMEB2)
M69013	Human guanine nucleotide-binding regulatory protein (G-y-alpha) mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
L22075	Human guanine nucleotide regulatory protein (G13) mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
NM_004297	Homo sapiens guanine nucleotide-binding protein 14 (GNA14) mRNA
M63904	Human G-alpha 16 protein mRNA, complete cds; Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)
X04526	Human liver mRNA for beta-subunit signal transducing proteins Gs/Gi (beta-G); Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
M16538	Human signal-transducing guanine nucleotide-binding regulatory (G) protein beta subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2
M24194	Human MHC protein homologous to chicken B complex protein mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1
M31328	Human guanine nucleotide-binding protein beta-3 subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3

【表１４】

表１４

AF017656	Homo sapiens G protein beta 5 subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5
U31383	Human G protein gamma-10 subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein 10
U31384	Human G protein gamma-11 subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein 11
NM_012202	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3 (GNG3), mRNA
AF052149	Homo sapiens clone 24733 mRNA sequence; Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3, linked
U31382	Human G protein gamma-4 subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein 4
AF038955	Homo sapiens G protein gamma 5 subunit mRNA; Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5
AB010414	Homo sapiens mRNA for G-protein gamma 7; Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7
S62027	transducin gamma subunit; Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 1
X01059	Human placenta mRNA for luteinizing hormone releasing hormone precursor (LHRH).
NM_005311	Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10), mRNA
M96995	Homo sapiens epidermal growth factor receptor-binding protein GRB2 (EGFRBP-GRB2) mRNA sequence
M73077	Human glucocorticoid receptor repression factor 1 (GRF-1) mRNA
X12510	Human mRNA for melanoma growth stimulatory activity (MGSA), groucho
X53799	Human mRNA for macrophage inflammatory protein-2alpha (MIP2alpha,; GRO2 oncogene
L33801	Human protein kinase mRNA; glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 beta); tau kinase subunit; factor A
X17644	Human GST1-Hs mRNA for GTP-binding protein; G1 to S phase transition 1
AF250138	Protein kinase H11;Homo sapiens small stress protein-like protein HSP22 mRNA
D49742	Human mRNA for HGF activator like protein (hyaluronan-binding protein 2)
D50405	Human mRNA for RPD3 protein, Histone deacetylase 1
D16431	Human mRNA for hepatoma-derived growth factor, complete cds

【表１５】

表１５

M60718	Human hepatocyte growth factor mRNA (HGF); scatter factor (SF); hepatopoeitin A
D14012	Human mRNA for hepatocyte growth factor (HGF) activator precursor
U51004	Homo sapiens protein kinase C inhibitor (PKCI-1) mRNA, Histidine triad nucleotide-binding protein
X58536	Human mRNA for HLA class I locus C heavy chain
K01171	Human HLA-DR alpha-chain mRNA; Class II MHC alpha
X02902	Human mRNA for HLA class II DR-beta 1 (Dw14); Class II MHC beta
M11867	Human MHC class II HLA DR5 DR-beta-chain mRNA, complete cds
U40992	Homo sapiens heat shock protein hsp40 homolog mRNA, complete cds; DnaJ-like heat shock protein 40

【表１６】

表１６

V00530	Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) IMP:pyrophosphate phosphoribosyltransferase
U76376	Homo sapiens activator of apoptosis Hrk (HRK) mRNA; Harakiri, BCL2-interacting protein (contains only BH3 domain)
AF068754	Homo sapiens heat shock factor binding protein 1 HSBP1 mRNA; Heat shock factor binding protein 1
AF088982	Homo sapiens heat shock protein hsp40-3 mRNA; Heat shock cognate 40
NM_000196	Homo sapiens hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2 (HSD11B2)
NM_000862	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (HSD3B1)
M64673	Human heat shock factor 1 (TCF5) mRNA, complete cds; Heat shock transcription factor 1
M65217	Human heat shock factor 2 (HSF2) mRNA, complete cds; Heat shock transcription factor 2
AB007131	Homo sapiens mRNA for HSF2BP; Heat shock transcription factor 2 binding protein
D87673	Homo sapiens mRNA for heat shock transcription factor 4; Heat shock transcription factor 4
X63368	H.sapiens HSJ1 mRNA; Heat shock protein, neuronal DNAJ-like 1
L08069	Human heat shock protein, E. coli DnaJ homologue mRNA, complete cds; Heat shock protein, DNAJ-like 2
AB003333	Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105D
NM_006597	Homo sapiens heat shock 70kD protein 10 (HSC71) (HSPA10), mRNA
NM_005345	Homo sapiens heat shock 70kD protein 1 (HSPA1A), mRNA; Heat shock 70kD protein 1
NM_005346	Homo sapiens heat shock 70kD protein 1 (HSPA1B), mRNA
D85730	Homo sapiens HSPA1L mRNA for Heat shock protein 70 testis variant, complete cds; Heat shock 70kD protein-like 1
U56725	Human heat shock protein mRNA, complete cds; Heat shock 70kD protein 2
L12723	Human heat shock protein 70 (hsp70) mRNA; Heat shock 70kD protein 4
X87949	H.sapiens mRNA for BiP protein; Heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein, 78kD)
X51758	Human mRNA for heat shock protein HSP70B'; Heat shock 70kD protein 6

【表１７】

表１７

L15189	Homo sapiens mitochondrial HSP75 mRNA; Heat shock 70kD protein 9B (mortalin-2)
X54079	Human mRNA for heat shock protein HSP27; Heat shock 27kD protein 1
D89617	Homo sapiens mRNA for MKBP; Heat shock 27kD protein 2
U15590	Homo sapiens heat shock 17kD protein 3 (HSPB3) mRNA, complete cds; Heat shock 27kD protein 3
AJ243191	Homo sapiens mRNA for cardiovascular heat shock protein; Heat shock 27kD protein family, member 7 (cardiovascular)
AF028832	Homo sapiens Hsp89-alpha-delta-N mRNA; Heat shock 90kD protein 1, alpha
M16660	Human 90-kDa heat-shock protein gene, cDNA; Heat shock 90kD protein 1, beta
M34664	Heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)
U07550	Human chaperonin 10 mRNA; Heat shock 10kD protein 1
D49547	Human mRNA for heat-shock protein 40; Heat shock 40kD protein 1
AF012106	Homo sapiens DnaJ protein (HSPF2) mRNA, complete cds; Heat shock 40kD protein 2
J03132	Human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA, CD54
M91196	Homo sapiens DNA-binding protein mRNA (Interferon consensus sequence binding protein 1)
NM_005531	Homo sapiens interferon, gamma-inducible protein 16 (IFI16) mRNA
X67325	H.sapiens p27 mRNA (interferon, alpha-inducible protein 27)
J03909	Human gamma-interferon-inducible protein (IP-30) mRNA, complete cds
X03557	Human mRNA for 56-KDa protein induced by interferon
AF083470	Homo sapiens interferon induced tetratricopeptide protein IFI60 (IFIT4) mRNA, complete cds
J04164	Human interferon-inducible protein 9-27 mRNA, complete cds
X57351	Human 1-8D gene from interferon-inducible gene family
X57352	Human 1-8U gene from interferon-inducible gene family
V00551	Messenger RNA for human leukocyte (alpha) interferon
V00538	Messenger RNA for human leukocyte (alpha) interferon
V00542	Messenger RNA for human leukocyte (alpha) interferon
M28585	Human leukocyte interferon-alpha mRNA, complete cds, clone pIFN105
M54886	Human interferon-alpha mRNA, complete cds
V00540	Messenger RNA for human leukocyte (alpha) interferon
V00541	Messenger RNA for human leukocyte interferon (one of eight).
V00550	Messenger RNA for human leukocyte (alpha) interferon.

【表１８】

表１８

J03171	Human interferon-alpha receptor (HuIFN-alpha-Rec) mRNA, complete cds
X77722	H.sapiens mRNA for interferon alpha/beta receptor
V00547	Human messenger RNA for fibroblast (beta) interferon
X13274	Human mRNA for interferon IFN-gamma
J03143	Human interferon-gamma receptor mRNA, complete cds
U05875	Human clone pSK1 interferon gamma receptor accessory factor-1 (AF-1) mRNA, complete cds
X02669	Human mRNA for type 1 interferon-omega 1.
Y08915	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1
X57025	Human IGF-I mRNA for insulin-like growth factor I
X04434	Human mRNA for insulin-like growth factor I receptor
J03242	Human insulin-lke growth factor II mRNA, complete cds
J03528	Human cation-independent mannose 6-phosphate receptor mRNA; insulin-like growth factor II receptor
M31145	Human insulin-like growth factor binding protein mRNA, complete cds
M35410	Human insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) mRNA
M31159	Human growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein mRNA, complete cds
M62403	Human insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4) mRNA, complete cds
AF055033	Homo sapiens clone 24645 insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) mRNA, complete cds
M62402	Human insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6) mRNA, complete cds
S75725	prostacyclin-stimulating factor [human, cultured diploid fibroblastcells, mRNA, 1124 nt].
AF044195	Homo sapiens IkappaB kinase complex associated protein (IKAP) mRNA, complete cds; IKKAP2
AF080158	Homo sapiens IkB kinase-b (IKK-beta) mRNA, IKK2/beta; IKK2
AF074382	Homo sapiens IkB kinase gamma subunit (IKK-gamma) mRNA, NLK
M57627	Human interleukin 10 (IL10) mRNA, complete cds
U00672	Human interleukin-10 receptor mRNA, complete cds
Z17227	Homo sapiens mRNA for transmebrane receptor protein
M57765	Human interleukin 11 mRNA, complete cds

【表１９】

表１９

Z38102	H.sapiens mRNA for interleukin-11 receptor
M65291	Human natural killer cell stimulatory factor (NKSF) mRNA, complete cds, clone p35
M65290	Human natural killer cell stimulatory factor (NKSF) mRNA, complete cds, clone p40
U03187	Human IL12 receptor component mRNA, complete cds
U64198	Human Il-12 receptor beta2 mRNA, complete cds
L06801	Homo sapiens interleukin 13 mRNA, complete cds
Y09328	H.sapiens mRNA for IL13 receptor alpha-1 chain
U70981	Human interleukin-13 receptor mRNA, complete cds
AF070546	Homo sapiens clone 24607 mRNA sequence
AF031167	Homo sapiens interleukin 15 precursor (IL-15) mRNA, complete cds.
U31628	Human interleukin-15 receptor alpha chain precursor (IL15RA) mRNA, complete cds
M90391	Homo sapiens putative IL-16 protein precursor, mRNA, complete cds
NM_014443	Homo sapiens interleukin 17B (IL17B), mRNA
NM_013278	Homo sapiens interleukin 17C (IL17C), mRNA
U58917	Homo sapiens IL-17 receptor mRNA, complete cds
D49950	Homo sapiens mRNA for interferon-gamma inducing factor(IGIF), complete cds
AB019504	Homo sapiens mRNA for interleukin-18 binding protein, complete cds
U43672	Human putative transmembrane receptor IL-1Rrp mRNA, complete cds
NM_013371	Homo sapiens interleukin 19 (IL19), mRNA
X02531	Human mRNA for interleukin 1-alpha
M15330	Human interleukin 1-beta (IL1B) mRNA, complete cds
M27492	Human interleukin 1 receptor mRNA, complete cds
X59770	H.sapiens IL-1R2 mRNA for type II interleukin-1 receptor, (cell line CB23).
D12763	Homo sapiens mRNA for ST2 protein

【表２０】

表２０

U49065	Human interleukin-1 receptor-related protein mRNA, complete cds
X53296	H.sapiens mRNA for IRAP
V00564	Human mRNA encoding interleukin-2 (IL-2) a lymphozyte regulatory molecule
X01057	Human mRNA for interleukin-2 receptor
M26062	Human interleukin 2 receptor beta chain (p70-75) mRNA, complete cds
D11086	Human mRNA for interleukin 2 receptor gamma chain
M17115	Human multilineage-colony-stimulating factor mRNA, complete cds
M74782	Human interleukin 3 receptor (hIL-3Ra) mRNA, complete cds
M13982	Human interleukin 4 (IL-4) mRNA, complete cds
X52425	Human IL-4-R mRNA for the interleukin 4 receptor
X04688	Human mRNA for T-cell replacing factor (interleukin-5).
M75914	Human interleukin 5 receptor alpha mRNA, complete cds
M14584	Human interleukin 6 mRNA, complete cds
X12830	Human mRNA for interleukin-6 (IL-6) receptor
M57230	Human membrane glycoprotein gp130 mRNA, Interleukin 6 signal transducer (oncostatin M receptor)
J04156	Human interleukin 7 (IL-7) mRNA, complete cds
M29696	Human interleukin-7 receptor (IL-7) mRNA, complete cds
M17017	Human beta-thromboglobulin-like protein mRNA, complete cds
L19591	Homo sapiens interleukin 8 receptor alpha (IL8RA) mRNA, complete cds
L19593	Homo sapiens interleukin 8 receptor beta (IL8RB) mRNA, complete cds
M30134	Human P40 protein mRNA, complete cds
M84747	Human interleukin 9 receptor mRNA, complete cds.
U58198	Human interleukin enhancer binding factor 3 mRNA
X60787	Human mRNA for transcription factor ILF
U10323	Human nuclear factor NF45 mRNA, complete cds
U10324	Human nuclear factor NF90 mRNA, complete cds
AF001954	Homo sapiens growth inhibitor p33ING1 (ING1) mRNA, complete cds
NM_001564	Homo sapiens inhibitor of growth family, member 1-like (ING1L) mRNA
NM_000207	Homo sapiens insulin (INS), mRNA
NM_005542	Homo sapiens insulin induced gene 1 (INSIG1)
NM_000208	Homo sapiens insulin receptor (INSR), mRNA.
M10051	Human insulin receptor mRNA, complete cds
J05046	Human insulin receptor-related receptor (IRR) mRNA, 3 ' end
NM_000209	Homo sapiens insulin promoter factor 1, homeodomain transcription factor (IPF1)

【表２１】

表２１

L76191	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) mRNA, complete cds
AF026273	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase-2 mRNA, complete cds
X14454	Human mRNA for interferon regulatory factor 1
X15949	Human mRNA for interferon regulatory factor-2 (IRF-2).
Z56281	H.sapiens mRNA for interferon regulatory factor 3
U52682	Human lymphocyte specific interferon regulatory factor/interferon regulatory factor 4 (LSIRF/IRF4) mRNA, complete cds
U51127	Human interferon regulatory factor 5 (Humirf5) mRNA, complete cds
AF027292	Homo sapiens interferon regulatory factor 6 (IRF6) mRNA, complete cds
U53830	Homo sapiens interferon regulatory factor 7A mRNA, complete cds
S62539	insulin receptor substrate-1 [human, skeletal muscle, mRNA, 5828 nt].
S62539	insulin receptor substrate-1 [human, skeletal muscle, mRNA, 5828 nt].
NM_003749	Homo sapiens insulin receptor substrate 2 (IRS2)
NM_003604	Homo sapiens insulin receptor substrate 4 (IRS4)
M13755	Human interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein mRNA (interferon-stimulated protein, 15 kDa)
U88964	Human HEM45 mRNA, complete cds
M87503	Human IFN-responsive transcription factor subunit mRNA; Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma (48kD); p48

【表２２】

表２２

L12002	Human integrin alpha 4 subunit mRNA, complete cds; Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
Y00796	Human mRNA for leukocyte-associated molecule-1 alpha subunit (LFA-1 alpha subunit)., CD11a
J03925	Integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)
X07979	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12);
M15395	Human leukocyte adhesion protein (LFA-1/Mac-1/p150,95 family) beta subunit mRNA, CD18
AF049893	Homo sapiens insulin upstream factor 1 (IUF1) mRNA
M64174	Human protein-tyrosine kinase (JAK1) mRNA, Janus kinase 1
AF005216	Homo sapiens receptor-associated tyrosine kinase (JAK2) mRNA, Janus kinase 2
U09607	Human JAK family protein tyrosine kinase (JAK3) mRNA, complete cds
NM_002228	Homo sapiens v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog (JUN) mRNA.
K00558	human alpha-tubulin mRNA, complete cds
AF039597	Ku86 autoantigen related protein 1
X61656	H.sapiens mRNA for growth factor receptor tyrosine kinase; Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
AB034989	KIAA0025 gene product; MMS-inducible gene; Homo sapiens mRNA for stress protein Herp
D23673	Human mRNA, clone HH109 (screened by the monoclonal antibody of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)).
M59964	Human stem cell factor mRNA; (SCF); mast cell growth factor (MGF); c-kit ligand (KITLG)
AF036905	Homo sapiens linker for activation of T cells (LAT) mRNA
M36881	Human lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (lck) mRNA
NM_000894	Homo sapiens luteinizing hormone beta polypeptide (LHB)
M73746	Homo sapiens lutropin/choriogonadotropin receptor (LHCGR) mRNA
M13451	Human lamin C mRNA, complete cds, Lamin A
M34458	Human lamin B mRNA, complete cds,
M94362	Human lamin B2 (LAMB2) mRNA, partial cds
NM_016103	Homo sapiens GTP-binding protein Sara (LOC51128), mRNA
AF125392	Homo sapiens insulin induced protein 2 mRNA, complete cds
AF119666	Homo sapiens insulin receptor tyrosine kinase substrate mRNA

【表２３】

表２３

D12614	Human mRNA for lymphotoxin (TNF-beta), complete cds
U77352	Homo sapiens MAP kinase-activating death domain protein (MADD) mRNA
U68018	Human mad protein homolog (hMAD-2) mRNA; JV18-1.MADR2 OR SMAD2
U68019	Homo sapiens mad protein homolog (hMAD-3) mRNA, complete cds
U44378	Human homozygous deletion target in pancreatic carcinoma (DPC4); mothers against dpp homolog 4 (SMAD4)
AF035528	Homo sapiens Smad6 mRNA, complete cds
AF010193	Homo sapiens MAD-related gene SMAD7 (SMAD7) mRNA, complete cds
NM_000240	Homo sapiens monoamine oxidase A (MAOA), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
M69177	Human monoamine oxidase B (MAOB) mRNA, complete cds
L11284	Homosapiens ERK activator kinase (MEK1) mRNA
L11285	Homosapiens ERK activator kinase (MEK2) mRNA
D87116	Human mRNA for MAP kinase kinase 3b ,complete cds, MEK3
U17743	Human JNK activating kinase (JNKK1) mRNA, complete cds; SEK1
U39064	Human MAP kinase kinase 6 mRNA, complete cds; MEK6
AF013588	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) mRNA, complete cds
AF042838	Homo sapiens MEK kinase 1 (MEKK1) mRNA, partial cds
Y10256	H.sapiens mRNA for serine/threonine protein kinase, NIK
NM_003188	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (MAP3K7), mRNA, TAK1
AF096300	Homo sapiens HPK/GCK-like kinase HGK mRNA, complete cds
M84489	Human extracellular signal-regulated kinase 2 mRNA; ERK2
U92268	Homo sapiens mitogen activated protein kinase p38-2 mRNA, complete cds
X79483	H.sapiens ERK6 mRNA for extracellular signal regulated kinase
X79483	H.sapiens ERK6 mRNA for extracellular signal regulated kinase
AF004709	Homo sapiens stress-activated protein kinase 4 (SAPK4) mRNA, complete cds

【表２４】

表２４

L35253	Human p38 mitogen activated protein (MAP) kinase mRNA; cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein (CSAID binding protein; CSBP); MAX-interacting protein 2 (MXI2)
L35253	Human p38 mitogen activated protein (MAP) kinase mRNA; cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein (CSAID binding protein; CSBP); MAX-interacting protein 2 (MXI2)
X60188	Human ERK1 mRNA for protein serine/threonine kinase
L26318	Human protein kinase (JNK1) mRNA; SAPK
X60287	H.sapiens max mRNA
NM_000529	Homo sapiens melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropic hormone)
M92424	Human homolog of mouse-double-minute 2; p53-associated mdm2 protein
AF007111	MDM2-like p53-binding protein (MDMX)
NM_002415	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) (MIF),
X72755	H.sapiens Humig mRNA
AB014888	Homo sapiens mRNA for MRJ
X70040	H.sapiens RON mRNA for tyrosine kinase; Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
M30817	Human interferon-induced cellular resistance mediator protein (MxA)mRNA
M30818	Human interferon-induced cellular resistance mediator protein (MxB) mRNA
U70451	Human myleoid differentiation primary response protein MyD88 mRNA, complete cds
NM_000261	Homo sapiens myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response (MYOC)
AF058696	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)
U08015	Human NF-ATc mRNA, complete cds
U43341	Human transcription factor NFAT1 isoform B (NFAT1) mRNA, complete cds
L41067	Homo sapiens NF-AT4c mRNA, complete cds
L41066	Homo sapiens NF-AT3 mRNA, complete cds
U26173	Human bZIP protein NF-IL3A (IL3BP1) mRNA, complete cds
M58603	Human nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF-kappa-B) mRNA, p105
X61498	H.sapiens mRNA for NF-kB subunit (p49/p100)
M69043	Homo sapiens MAD-3 mRNA encoding IκB-like activity, complete cds, IκBalpha
L40407	Homo sapiens thyroid receptor interactor (TRIP9) gene, complete cds

【表２５】

表２５

U91616	Human I kappa B epsilon (IkBe) mRNA, complete cds
X77909	H.sapiens IKBL mRNA
U16258	Human I kappa BR mRNA, complete cds
U08191	Human R kappa B mRNA, complete cds
X52599	Human mRNA for beta nerve growth factor
M14764	Human nerve growth factor receptor mRNA
D50420	Non-histone chromosome protein 2 (S. cerevisiae)-like 1
U17327	Human neuronal nitric oxide synthase (NOS1) mRNA
U20141	Human inducible nitric oxide synthase mRNA
M93718	Human nitric oxide synthase mRNA (endothelial)
M10901	Human glucocorticoid receptor alpha mRNA, complete cds
L12260	Human recombinant glial growth factor 2 mRNA, complete cds and flanking regions (neuregulin 1)
M86528	Human neurotrophin-4 (NT-4) gene; neurotrophin 5 (neurotrophin 4/5) (NTF5)
U46752	Oxidative stress induced like; Human phosphotyrosine independent ligand p62B B-cell isoform for the Lck SH2 domain mRNA, partial cds
M25650	Human oxytocin mRNA
X64878	H.sapiens mRNA for oxytocin receptor
AF000546	Homo sapiens purinergic receptor P2Y5 mRNA
U24152	Human p21-activated protein kinase (PAK-alpha; PAK1)
U24153	Human p21-activated protein kinase (PAK-gamma; PAK2); PAK65; S6/H4 kinase
U41745	Human PDGF associated protein mRNA (PAP)
NM_002592	Homo sapiens proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA
AF100928	Homo sapiens apoptosis-inducing factor AIF mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein; Programmed cell death 8
X06374	Human platelet-derived growth factor A subunit precursor (PDGFA; PDGF-1)
M21574	Human platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) mRNA; CD140A antigen

【表２６】

表２６

M21616	Human platelet-derived growth factor receptor mRNA (PDGFRB); CD140B antigen
M28526	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen), neutrophil; CD31
NM_006211	Homo sapiens proenkephalin (PENK), mRNA
X54936	H.sapiens mRNA for placenta growth factor (PlGF).
AF010310	p53 induced protein (Proline oxidase homolog)
Y13367	H.sapiens mRNA for phosphoinositide 3-kinase; Phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide
Y11312	H.sapiens mRNA for phosphoinositide 3-kinase, Phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide
AJ000008	Homo sapiens mRNA for C2 domain containing PI3-kinase, phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide
Z46973	H.sapiens mRNA for phosphatidylinositol 3-kinase, Phosphoinositide-3-kinase, class 3
U79143	Human phosphoinositide 3'-hydroxykinase p110-alpha subunit mRNA, Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
S67334	phosphatidylinositol 3-kinase p110 beta isoform=110 kda catalytic subunit [human, mRNA Partial, 3213 nt]. Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide
U86453	Human phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit p110delta mRNAPhosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide
X83368	H.sapiens mRNA for phosphatidylinositol 3 kinase gamma, Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
M61906	Human P13-kinase associated p85, Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)
X80907	H.sapiens mRNA for p85 beta subunit of phosphatidyl-inositol-3-kinase, Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)
D88532	Homo sapiens mRNA for p55pik, Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)
Y08991	H.sapiens mRNA for adaptor protein p150, Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4
M72393	Human calcium-dependent phospholipid-binding protein (PLA2) mRNA; Phospholipase A2, group IVA (cytosolic)
NM_003560	Homo sapiens phospholipase A2, group VI (cytosolic, calcium-independent) (PLA2G6)
AF019770	Homo sapiens macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) mRNA (prostate differentiation factor)

【表２７】

表２７

M95678	Homo sapiens phospholipase C-beta-2 mRNA; Phospholipase C, beta 2
Z16411	H.sapiens mRNA encoding phospholipase c; Phospholipase C, beta 3 (phosphatidylinositol-specific)
L41349	Homo sapiens phospholipase C beta 4 (PLCB4) mRNA; Phospholipase C, beta 4
M34667	Human phospholipase C-gamma mRNA, complete cds
X05199	Human mRNA for plasminogen
J03727	Human phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA, complete cds
NM_000939	Homo sapiens proopiomelanocortin (adrenocorticotropin/ beta-lipotropin/ alpha-melanocyte stimulating hormone/ beta-melanocyte stimulating hormone/ beta-endorphin) (POMC)
NM_000306	Homo sapiens POU domain, class 1, transcription factor 1 (Pit1, growth hormone factor 1) (POU1F1)
L14778	Human calmodulin-dependent protein phosphatase catalytic subunit (PPP3CA) mRNA, complete cds and alternative exon
M29551	Human calcineurin A2 mRNA;
S46622	calcineurin A catalytic subunit [human, testis, mRNA, 2134 nt]; Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform (calcineurin A gamma)
M28393	Human perforin mRNA, complete cds
X52479	Human PKC alpha mRNA for protein kinase C alpha; Protein kinase C, alpha
AL049654	Novel human mRNA similar to mouse gene PICK1 ;Protein kinase C, alpha binding protein
X06318	Human mRNA for protein kinase C (PKC) type beta 1; Protein kinase C, beta 1
U48251	Homo sapiens protein kinase C-binding protein RACK7 mRNA, partial cds; Protein kinase C binding protein 1
U48250	Human protein kinase C-binding protein RACK17 mRNA, partial cds; Protein kinase C binding protein 2
D10495	Homo sapiens mRNA for protein kinase C delta-type; Protein kinase C, delta
X65293	H.sapiens mRNA for protein kinase C-Epsilon; Protein kinase C, epsilon
Z15114	H.sapiens mRNA for protein kinase C gamma (partial); Protein kinase C, gamma
M55284	Human protein kinase C-L (PRKCL) mRNA; Protein kinase C, eta
L18964	Human protein kinase C iota isoform (PRKCI) mRNA; Protein kinase C, iota
D26181	Human mRNA for novel protein kinase PKN; Protein kinase C-like 1
U33052	Human lipid-activated, protein kinase PRK2 mRNA; Protein kinase C-like 2
X75756	H.sapiens mRNA for protein kinase C mu; Protein kinase C, mu
AB015982	Homo sapiens EPK2 mRNA for serine/threonine kinase; Protein kinase C, nu

【表２８】

表２８

L07032	Human protein kinase C theta (PKC) mRNA; Protein kinase C, theta
J03075	Human 80K-H protein (kinase C substrate) mRNA; Protein kinase C substrate 80K-H
Z15108	H.sapiens mRNA for protein kinase C zeta; Protein kinase C, zeta
U47077	Homo sapiens DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) mRNA

【表２９】

表２９

M59979	prostaglandin G/H synthase 1 precursor (PGH synthase 1; PGHS1; PTGS1); cyclooxygenase 1 (COX1)
M90100	prostaglandin G/H synthase 2 precursor (PGH synthase 2; PGHS2; PTGS2); cyclooxygenase 2 (COX2)
D13540	Homo sapiens SH-PTP3 mRNA for protein-tyrosine phosphatase; Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; Shp2
D21210	Human mRNA for protein tyrosine phosphatase (PTP-BAS, type 2); Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase); FAP
X62055	H.sapiens PTP1C mRNA for protein-tyrosine phosphatase 1C.; Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6; SHP-1
D11327	Human mRNA for protein-tyrosine phosphatase; Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7, HePTP
Y00062	Human mRNA for T200 leukocyte common antigen (CD45, LC-A).
AF060231	Homo sapiens herpesvirus entry protein C (HVEC) mRNA; Poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C; nectin)
M29870	Human ras-related C3 botulinum toxin substrate (rac) mRNA ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; p21-rac1; ras-like protein TC25
M29871	Human ras-related C3 botulinum toxin substrate (rac) mRNA; p21-rac2; small G protein
Z75311	RAD50 (S. cerevisiae) homolog
AF029670	RAD51 (S. cerevisiae) homolog C
AF086904	Protein kinase Chk2
M23379	Human GTPase-activating protein ras p21 (RASA) mRNA; GAP
M15400	Human retinoblastoma susceptibility mRNA, complete cds (RB1)
NM_002892	Homo sapiens retinoblastoma-binding protein 1 (RBBP1) mRNA
S66431	RBP2=retinoblastoma binding protein 2 [human, Nalm-6 pre-B cell leukemia, mRNA, 6455 nt].
X74262	Human chromatin assembly factor 1 p48 subunit (CAF1 p48 subunit); retinoblastoma-binding protein 4
X85134	H.sapiens RBQ-3 mRNA
X85133	H.sapiens RBQ-1 mRNA
U35143	Human retinoblastoma-binding protein (RbAp46) mRNA, complete cds
AF043431	Homo sapiens retinoblastoma-interacting protein (RBBP8) mRNA, complete cds

【表３０】

表３０

AF039564	Homo sapiens retinoblastoma binding protein (RBBP9) mRNA, complete cds.
L14812	Human retinoblastoma related protein (p107) mRNA; Retinoblastoma-like 1
X74594	Human retinoblastoma-like protein 2 (RBL2; RB2); 130-kDa retinoblastoma-associated protein (p130)
L19067	Human NF-kappa-B transcription factor p65 subunit mRNA, complete cds.
M83221	Homo sapiens I-Rel mRNA, complete cds.
NM_000537	Homo sapiens renin (REN)
AF037195	Homo sapiens regulator of G protein signaling RGS14 mRNA, complete cds.
U50062	Homo sapiens RIP protein kinase mRNA, Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
AF027706	Homo sapiens serine/threonine kinase RICK (RICK) mRNA; RIP2
M63488	Replication protein A1 (70kD)
X56932	H.sapiens mRNA for 23 kD highly basic protein
U14971	Human ribosomal protein S9 mRNA, complete cds
AF020044	Homo sapiens lymphocyte secreted C-type lectin precursor, mRNA, complete cds
M57502	Human secreted protein (I-309) mRNA; Small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3)
D49372	Human mRNA for eotaxin; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 11 (eotaxin)
U59808	Human monocyte chemotactic protein-4 precursor (MCP-4) mRNA; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 13
Z49270	H.sapiens mRNA for chemokine HCC-1; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 14
AF031587	Homo sapiens MIP-1 delta mRNA; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 15
AF039955	Homo sapiens liver CC chemokine-1 precursor (SCYA16) mRNA; Small inducible cytokine subfamily A, member 16
D43767	Human mRNA for chemokine; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 17
Y13710	Homo sapiens mRNA for alternative activated macrophage specific CC chemokine 1; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 18, pulmonary and activation-regulated
U77180	Human macrophage inflammatory protein 3 beta (MIP-3beta), Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 19
S71513	monocyte chemoattractant protein-1 [human, mRNA, 739 nt], MCP-1

【表３１】

表３１

U77035	Human macrophage inflammatory protein 3 alpha (MIP-3a) mRNA; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20
AF001979	Homo sapiens beta chemokine mRNA; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 21
U83171	Human macrophage-derived chemokine precursor (MDC) mRNA; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 22
U58913	Human chemokine (hmrp-2a) mRNA; small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 23
U85768	Human myeloid progenitor inhibitory factor-1 MPIF-2 mRNA

【表３２】

表３２

U86358	Human chemokine (TECK) mRNA; Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 25
AB010447	Homo sapiens mRNA for CC chemokine eotaxin3;Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 26
AJ243542	Homo sapiens mRNA for CCL27 chemokine, small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 27
M23452	Human macrophage inflammatory protein (G0S19-1) mRNA, Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 3; Mip-1a
J04130	Human activation (Act-2) mRNA, complete cds
M21121	Human T cell-specific protein (RANTES) mRNA, Small inducible cytokine A5
X72308	Homo sapiens mRNA for monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3), Small inducible cytokine A7 (monocyte chemotactic protein 3)
Y10802	H.sapiens mRNA for monocyte chemotactic protein 2
X02530	Human mRNA for gamma-interferon inducible early response gene (with homology to platelet proteins).
AF030514	Homo sapiens interferon stimulated T-cell alpha chemoattractant precursor, mRNA, complete cds
AF073957	Homo sapiens CXC chemokine BRAK mRNA,Small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14
X78686	H.sapiens ENA-78 mRNA; Small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78)
U81234	Human chemokine alpha 3 (CKA-3) mRNA; small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2)
D43768	numan mRNA for SCM-1 (single cysteine motif-1); Small inducible cytokine subfamily C, member 1 (lymphotactin)
NM_003175	Homo sapiens small inducible cytokine subfamily C, member 2 (SCYC2), mRNA.
U84487	Human CX3C chemokine precursor, mRNA, alternatively spliced, complete cds
U10117	Human endothelial-monocyte activating polypeptide II mRNA; small inducible cytokine subfamily E, member 1 (endothelial monocyte-activating)
L36033	Human pre-B cell stimulating factor homologue (SDF1b) mRNA, complete cds; Stromal cell-derived factor 1
M30640	selectin E (endothelial adhesion molecule 1)
M25280	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)

【表３３】

表３３

M25322	selectin P (granule membrane protein 140kD, antigen CD62)
U02297	selectin P ligand
X68148	H.sapiens SHC mRNA, Src homology 2 domain-containing transforming protein 1
M20747	Human insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) mRNA; Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
NM_001043	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2 (SLC6A2)
NM_000454	Homo sapiens superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult)) (SOD1); Superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
X07834	Human mRNA for manganese superoxide dismutase; Superoxide dismutase 2, mitochondrial
J02947	Human extracellular-superoxide dismutase (SOD3) mRNA; Superoxide dismutase 3, extracellular
L13858	Human guanine nucleotide exchange factor mRNA, complete cds, SOS1, Sons of Sevenless
M60618	Human nuclear autoantigen (SP-100) mRNA
NM_000582	Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) (SPP1)
U83867	Human alpha II spectrin mRNA, Fodrin
J03161	Human serum response factor (SRF) mRNA; Serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)
D86640	Homo sapiens mRNA for stac, (src homology three (SH3) and cysteine rich domain)
M97935	Homo sapiens transcription factor ISGF-3 mRNA, complete cds
M97934	Homo sapiens interferon alpha induced transcriptional activator (ISGF-3) mRNA sequence
L29277	Homo sapiens DNA-binding protein (APRF) mRNA, complete cds
L78440	Homo sapiens STAT4 mRNA, complete cds
L41142	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription (STAT5) mRNA
U16031	Human transcription factor IL-4 Stat mRNA, complete cds
U04735	Human microsomal stress 70 protein ATPase core (stch) mRNA; Stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kD
U26424	Human Ste20-like kinase (MST2) mRNA; Serine/threonine kinase 3 (Ste20, yeast homolog)
U60207	Human stress responsive serine/threonine protein kinase Krs-2 mRNA, Serine/threonine kinase 4

【表３４】

表３４

L28824	Homo sapiens protein tyrosine kinase (Syk) mRNA; Spleen tyrosine kinase
U49928	Homo sapiens TAK1 binding protein (TAB1) mRNA, complete cds
U63830	Human TRAF family member-associated NF-kB activator TANK mRNA, I-TRAF
M57732	Human hepatic nuclear factor 1 (TCF1) mRNA
M83233	Homo sapiens transcription factor (HTF4) mRNA, complete cds
U08336	Human basic helix-loop-helix transcription factor mRNA, complete cds
D89928	Homo sapiens HKL1 mRNA, complete cds

【表３５】

表３５

NM_007109	Homo sapiens transcription factor 19 (SC1) (TCF19), mRNA
X58840	Human mRNA for variant hepatic nuclear factor 1 (vHNF1), TCF2
U19345	Homo sapiens AR1 (TCF20) mRNA, partial cds
AF047419	Homo sapiens epicardin mRNA, complete cds.
M31523	Human transcription factor (E2A) mRNA, complete cds
NM_003199	Homo sapiens transcription factor 4 (TCF4)
M62810	Human mitochondrial transcription factor 1 mRNA
NM_003202	Homo sapiens transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) (TCF7) mRNA.
Y11306	Homo sapiens mRNA for hTCF-4
D15050	Human mRNA for transcription factor AREB6; Transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression)
D43642	Human YL-1 mRNA for YL-1 protein (nuclear protein with DNA-binding ability), complete cds
AB012124	Homo sapiens TCFL5 mRNA for transcription factor-like 5, complete cds
NM_003212	Homo sapiens teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1) mRNA
L23959	Homo sapiens E2F-related transcription factor (DP-1) mRNA, complete cds.
NM_003227	Homo sapiens transferrin receptor 2 (TFR2), mRNA
X01060	Human mRNA for transferrin receptor
X70340	H.sapiens mRNA for transforming growth factor alpha
X02812	Human transforming growth factor-beta (TGF-beta; TGFB)
M19154	Human transforming growth factor-beta-2 mRNA; glioblastoma -derived T-cell suppressor factor (G-TSF); bsc-1 cell growth inhibitor; polyergin; cetermin
J03241	Human transforming growth factor-beta 3 (TGF-beta3) mRNA, complete cds.
L11695	Human activin receptor-like kinase (ALK-5) mRNA, complete cds
D50683	Homo sapiens mRNA for TGF-betaIIR alpha, complete cds
L07594	Human transforming growth factor-beta type III receptor (TGF-beta) mRNA, complete cds
NM_000360	Homo sapiens tyrosine hydroxylase (TH), mRNA
L33410	Human c-mpl ligand (ML) mRNA, complete cds
NM_006288	Homo sapiens Thy-1 cell surface antigen (THY1), mRNA
U02571	Human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 precursor (TIMP-3) mRNA, complete cds

【表３６】

表３６

U88540	Homo sapiens Toll-like receptor 1 (TLR1) mRNA, complete cds
U88878	Homo sapiens Toll-like receptor 2 (TLR2) mRNA, complete cds
U88879	Homo sapiens Toll-like receptor 3 (TLR3) mRNA, complete cds
U88880	Homo sapiens Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA, complete cds
U88881	Homo sapiens Toll-like receptor 5 (TLR5) mRNA, partial cds.
M10988	Human tumor necrosis factor (TNF) mRNA
M59465	Human tumor necrosis factor alpha inducible protein A20 mRNA complete cds
M31165	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
AF016268	Homo sapiens death receptor 5 (DR5) mRNA, Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
AF016267	Homo sapiens TRAIL receptor 3 mRNA, complete cds
AF018253	Homo sapiens receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) mRNA, complete cds
U94332	Human osteoprotegerin (OPG) mRNA, complete cds
U74611	Human Apo-3 mRNA; Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12 (translocating chain-association membrane protein)
NM_001192	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17 (TNFRSF17), mRNA
X55313	H.sapiens TNF-R mRNA for tumor necrosis factor receptor type 1.
M32315	Human tumor necrosis factor receptor mRNA, TNF R2
X75962	H.sapiens mRNA for OX40 homologue
X60592	Human CDw40 mRNA for nerve growth factor receptor-related B-lymphocyte activation molecule; CD40
X63717	H.sapiens mRNA for APO-1 cell surface antigen, FAS
M83554	H.sapiens lymphocyte activation antigen CD30 mRNA, complete cds
L12964	Human activation dependent T cell mRNA, complete cds
U37518	Human TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL mRNA, complete cds
AF053712	Homo sapiens osteoprotegerin ligand mRNA, complete cds

【表３７】

表３７

AF039390	Homo sapiens vascular endothelial cell growth inhibitor (VEGI) mRNA, partial cds
D90224	Human mRNA for glycoprotein 34 (gp34).
L07414	Human CD40-ligand mRNA (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5); CD40L
D38122	Human mRNA for Fas ligand, complete cds; FasL
L09753	Homo sapiens CD30 ligand mRNA, complete cds.
U03398	Human receptor 4-1BB ligand mRNA, complete cds
M14695	Human p53 cellular tumor antigen mRNA, complete cds
U58334	Human Bcl2, p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2) mRNA
NM_005427	Homo sapiens tumor protein p73 (TP73) mRNA: Human p73 (monoallelically expressed p53-related protein)
X02592	Human mRNA for T-cell receptor alpha chain (TCR-alpha).
L41690	Homo sapiens TNF receptor-1 associated protein (TRADD) mRNA, 3' end of cds
NM_005658	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1) mRNA.
U12597	Human tumor necrosis factor type 2 receptor associated protein (TRAP3) mRNA, complete cds
NM_003300	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3) mRNA.
X80200	H.sapiens MLN62 mRNA (TNF receptor-associated factor 4)
AB000509	Homo sapiens mRNA for TRAF5, complete cds
U78798	Human TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) mRNA, complete cds
AF043254	Homo sapiens heat shock protein 75 (hsp75) mRNA, partial cds (tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein)
M12886	Human T-cell receptor active beta-chain mRNA, complete cds
U35048	Human putative regulatory protein TGF-beta-stimulated clone 22 homolog (TSC22)
NM_000549	Homo sapiens thyroid stimulating hormone, beta (TSHB)
NM_000369	Homo sapiens thyroid stimulating hormone receptor (TSHR)
X54637	Human tyk2 mRNA for non-receptor protein tyrosine kinase; Tyrosine kinase 2
M26880	Human ubiquitin mRNA, complete cds
AF016371	Homo sapiens U-snRNP-associated cyclophilin (USA-CyP) mRNA, complete cds
NM_001078	Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)
M32977	Human heparin-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA
U48801	Human vascular endothelial growth factor B precursor (VEGFB)

【表３８】

表３８

U43142	Human vascular endothelial growth factor related protein VRP mRNA vascular endothelial growth factor C precursor (VEGF-C); FLT4 ligand
U10564	Human CDK tyrosine 15-kinase WEE1Hu (Wee1Hu) mRNA, complete cds.
AF100779	Homo sapiens connective tissue growth factor related protein WISP-1 (WISP1) mRNA, complete cds
AF100780	Homo sapiens connective tissue growth factor related protein WISP-2 (WISP2) mRNA, complete cds.
AF100781	Homo sapiens connective tissue growth factor related protein WISP-3 (WISP3) mRNA, complete cds.
U81787	Human Wnt10B mRNA, complete cds
Y12692	Homo sapiens mRNA for WNT11 gene
X07876	Human mRNA for irp protein (int-1 related protein) Wingless-type MMTV integration site family member 2
Z71621	H.sapiens Wnt-13 mRNA
U53476	Human proto-oncogene Wnt7a mRNA, complete cds.
Y11094	H.sapiens mRNA for WNT-8B protein
L20422	Human 14-3-3n protein mRNA; Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
M86400	Human phospholipase A2 mRNA, complete cds
L05148	Human protein tyrosine kinase related mRNA sequence; Zeta-chain (TCR) associated protein kinase (70 kD)

次に、１．遺伝子配列ファイルの読み込み工程、２．塩濃度・ハイブリダイゼーション等の実験条件の入力工程、３．固定化ＤＮＡ断片の長さ範囲の入力工程、４．　固定化ＤＮＡ断片の融解温度を計算し、その融解温度がある一定の範囲を外れているＤＮＡ断片を候補リストから除外する工程、５．　特異な高次構造をとる短配列や短繰り返し配列のあるＤＮＡ断片を候補リストから除外する工程、６．Ａｌｕ配列などの反復配列とのホモロジーの高いＤＮＡ断片を候補リストから除外する工程、７．他遺伝子配列とのホモロジーの高いＤＮＡ断片を候補リストから除外する工程等からなるアルゴリズムに従って、特異性が高く、Ｔｍが揃ったオリゴヌクレオチドプローブ７９３本を設計した。設計した７９３の配列をオリゴヌクレオチド合成装置で一本ずつ合成した。それら７９３種類のヒト遺伝子プローブと、３種類のヒトに存在しないオリゴヌクレオチド配列（ラムダＤＮＡ、ｐＵＣ１８プラスミドＤＮＡ、Ｍ１３ｍｐ１８ＤＮＡ）を校正用外部標準遺伝子として加えた７９６種類のオリゴヌクレオチドを以下に開示する方法でガラ

ス基板上に固定化した。

まず、市販のスライドガラス（Ｇｏｌｄ　Ｓｅａｌ　Ｂｒａｎｄ社製）をアルカリ溶液（水酸化ナトリウム；５０ｇ、蒸留水；１５０ｍｌ、９５％エタノール；２００ｍｌ）に室温で２時間浸した。その後、スライドガラスを蒸留水中に移し３回リンスしてアルカリ溶液を完全に除去した。続いて、洗浄したスライドガラスを１０％のポリ－Ｌ－リジン（シグマ社製）水溶液に１時間浸した後、スライドガラスを引き出しマイクロタイタープレート用遠心機を用いて５００ｒ．ｐ．ｍ．で１分間遠心してポリ－Ｌ－リジン水溶液を除去した。次に、スライドガラスを吸引式恒温機に入れ、４０℃で５分間乾燥させスライドガラス上にアミノ基を導入した。さらに、アミノ基が導入されたスライドガラスを１ｍＭのＧＭＢＳ（ＰＩＥＲＣＥ社製）ジメチルスルホキシド溶液に２時間浸した後、スライドガラスをジメチルスルホキシドで洗浄してスライドガラス表面にマレイミド基を導入した。そしてＤＮＡ自動合成機（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ社製、ｍｏｄｅｌ　３９４　ＤＮＡ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ）を用いてチオール基が導入されたオリゴヌクレオチドを合成した後、高速液体クロマトグラフィでオリゴヌクレオチドを精製した。次に、合成・精製された濃度２μＭのオリゴヌクレオチド１μｌとＨＥＰＥＳ緩衝溶液（Ｎ－２－ヒドロキシエチルピペラジン－Ｎ，－２－エタンスルホン酸；１０ｍＭ、ｐＨ６．５）４μｌと添加剤（エチレングリコール）５μｌを混合してスポッティング溶液を作成した。調整されたスポッティング溶液をスポッタ（日立ソフト社製　ＳＰＢＩＯ　２０００）を用いてスライドガラス上の任意の点にスポッティングした後、スライドガラスを室温で２時間放置してスライドガラス上にオリゴヌクレオチドを固定化した。

その際、ＤＮＡアレイの測定結果を測定者が目視により瞬時に理解し判定できることを意図して、図１もしくは図２に開示した配置でプローブを固定化した。プローブ配置は前記（１）から（９）の遺伝子分類に基づいて行った。

３日徹夜した直後の被検査者から末梢血を５０ｃｃ採取し、直ちに白血球細胞からメッセンジャーＲＮＡを抽出して、－８０℃で保存した。１週間十分休養をとった後の同被検査者から５０ｃｃ末梢血を採取し、同一の方法でメッセンジャーＲＮＡを抽出した。徹夜直後のメッセンジャーＲＮＡをＣｙ５－ｄＣＴＰを用い

た逆転写反応によりＣｙ５で標識したｃＤＮＡを合成した。十分休養をとった後のメッセンジャーＲＮＡをＣｙ３-ｄＣＴＰを用いた逆転写反応によりＣｙ３で標識したｃＤＮＡを合成した。

Ｃｙ５標識ｃＤＮＡとＣｙ３標識ｃＤＮＡを等量混合した後、前記オリゴヌクレオチドアレイにかけハイブリダイゼーションを６２℃、１２時間行った。洗浄後スキャナー（ＧＳＩ－Ｌｕｍｏｎｉｃｓ社製ＳｃａｎＡｒｒａｙ　５０００）により各スポットの蛍光強度を測定した。測定後の画像を図３に示す。なおプローブ固定化配置は図２のように行った。Ｃｙ５蛍光強度/Ｃｙ３蛍光強度（徹夜/休養）の値が大きいほど、図３では黒が濃く表示されている。睡眠不足により免疫強度が低下することが経験上知られているが、図３によると、図２で示した炎症に関する遺伝子の多くと、細胞死に関する遺伝子が発現していることがわかる。３日徹夜をすることで、急性疲労の状態となり免疫系の遺伝子発現が起こったり、アポトーシスが生じたりしたものと考えられる。またストレス応答の一環としてＨＳＰなどのストレス耐性遺伝子の発現増加も一部見られる。このように、本発明のアレイを用いることで、ストレスの程度を評価することができる。

神経系、内分泌系、免疫系の3者に種々の変化が起こり、かつ相互に密接に関連することで複雑なストレス反応が生じると考えられる。血液中の特定のホルモン量を測定するといった従来法は、例えば内分泌系のみに着目した測定をしているにすぎず、神経系、内分泌系、免疫系の３者の相互作用を無視していた。このため従来法よるストレスの程度の評価は、ホルモン量の個人差が大きいなどの理由から、ストレスの程度と相関関係を得ることが困難であった。この従来法の欠点を鑑み、本発明においては神経系、内分泌系、免疫系のそれぞれの変化のみならず、神経系、内分泌系、免疫系の３者がどのように相互作用しているのかを知ること、とくに三者間の相互作用の強弱（バランス）に着目したことにより本発明を完成するに至った。

【０００９】

【発明の効果】

本発明は、上記ストレス応答に関する検討結果をもとに完成されたものであって、本発明のオリゴヌクレオチドアレイを用いることで、ストレスの程度を、個

々の遺伝子だけでなく、神経系、内分泌系、免疫系それぞれのバランスの変化に着目して簡便に調べることができる。特に、「生と死」、「炎症と抗炎症」という２つの座標軸を考慮して個々の遺伝子を基板上に配置したことで、直感的な結果の解釈を行えるように配慮した。また、本発明のアレイではあらかじめストレス応答に深くかかわるオリゴヌクレオチドプローブを絞り込んでいるため、アレイのプローブとして用いるオリゴヌクレオチドの種類の数を少なく抑えることができることから、価格低減が可能である。また１つの種類のオリゴヌクレオチドを複数箇所にプローブとして固定すれば、複数箇所の信号強度を平均化することで信頼性を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】

基板へのプローブＤＮＡ配置例（その１）。

【図２】

基板へのプローブＤＮＡ配置例（その２）。

【図３】

本発明におけるストレス評価の例。

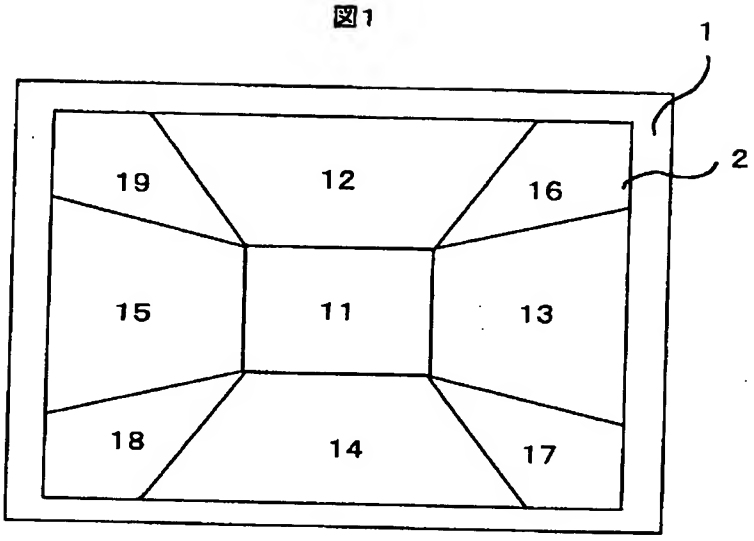
【符号の説明】

１.基板、２．プローブＤＮＡ固定化領域、１１　．ハウスキーピング遺伝子プローブＤＮＡ、１２　．ストレス耐性・生存に関与する遺伝子やホルモンのプローブＤＮＡ、１３　．炎症・免疫応答・増殖に関与する遺伝子プローブＤＮＡ、１４　．細胞死を誘導する遺伝子プローブＤＮＡ、１５　．抗炎症・創傷治癒・増殖抑制に関与する遺伝子プローブＤＮＡ、１６　．免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子のプローブＤＮＡ、１７　．サイトカインの誘導に関与する転写因子やシグナル分子のプローブＤＮＡ、１８　．増殖抑制に関与する転写因子やシグナル分子のプローブＤＮＡ、１９　．ストレス耐性に関与する転写因子やシグナル分子のプローブＤＮＡ。

【書類名】　図面

【図１】

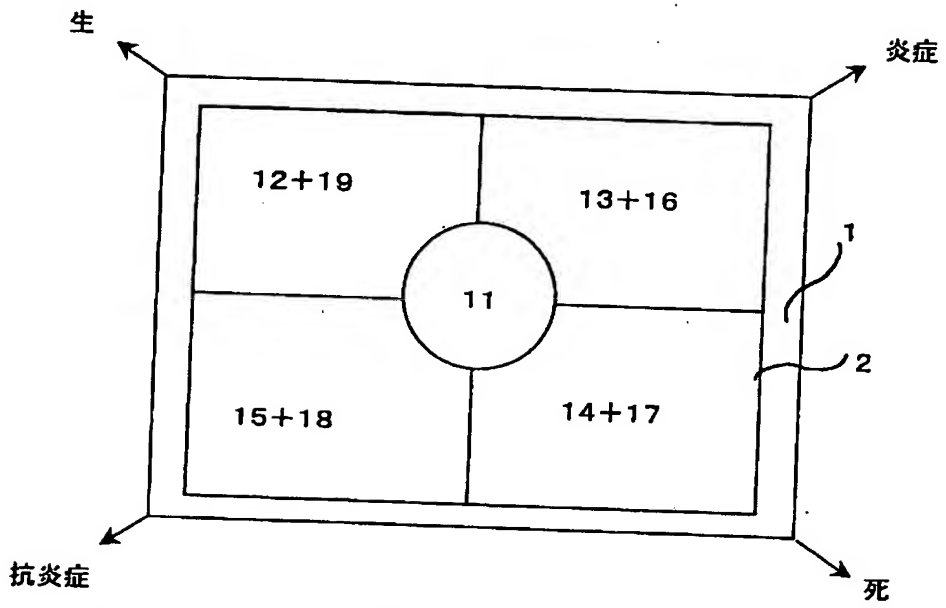
図1



１１．ハウスキーピング遺伝子
１２．ストレス耐性・生存に関与する遺伝子やホルモン
１３．炎症・免疫応答・増殖に関与する遺伝子
１４．細胞死を誘導する遺伝子
１５．抗炎症・創傷治癒・増殖抑制に関与する遺伝子
１６．免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子
１７．サイトカインの誘導に関与する転写因子やシグナル分子
１８．増殖抑制に関与する転写因子やシグナル分子
１９．ストレス耐性に関与する転写因子やシグナル分子

【図２】

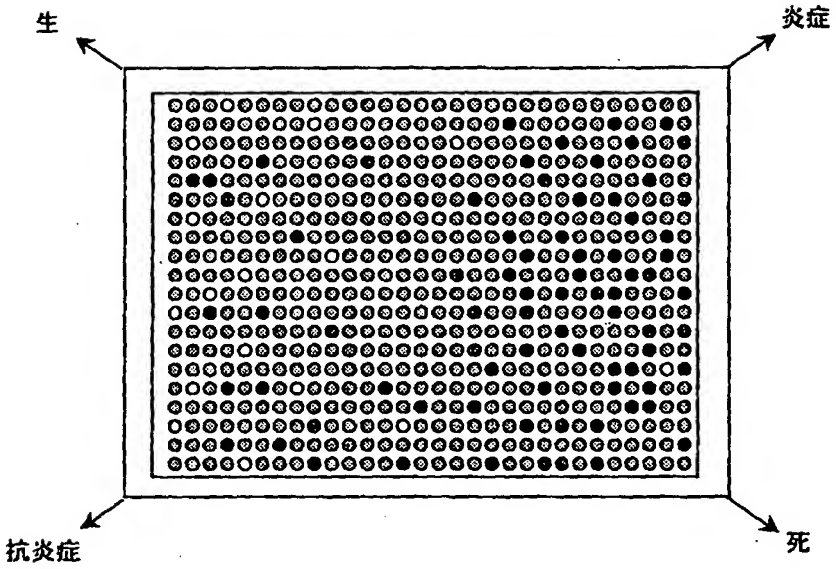
図2



11．ハウスキーピング遺伝子
12．ストレス耐性・生存に関与する遺伝子やホルモン
13．炎症・免疫応答・増殖に関与する遺伝子
14．細胞死を誘導する遺伝子
15．抗炎症・創傷治癒・増殖抑制に関与する遺伝子
16．免疫応答に関与する転写因子やシグナル分子
17．サイトカインの誘導に関与する転写因子やシグナル分子
18．増殖抑制に関与する転写因子やシグナル分子
19．ストレス耐性に関与する転写因子やシグナル分子

【図３】

図3



【書類名】　要約書

【要約】

【課題】本発明の目的は、ストレスの程度を簡便、低コストで評価できるオリゴヌクレオチドアレイを提供することにある。

【解決手段】　オリゴヌクレオチドを生体のストレス反応に関与する遺伝子あるいは遺伝子の相補配列鎖とし、かつオリゴヌクレオチドを遺伝子機能により分類して、分類ごとに支持体上の固定化領域を分ける。

【発明の効果】　被検査者のストレスの程度を遺伝子レベルで簡便に、検査結果を一目で直感的に理解することができる。

【選択図】　図２

認定・付加情報

特許出願の番号	特願２００１－０５３４６５
受付番号	５０１００２７９４２６
書類名	特許願
担当官	第五担当上席　　００９４
作成日	平成１３年　３月　１日

＜認定情報・付加情報＞

【提出日】　平成13年 2月28日

次頁無

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　〔０００００５１０８〕

１．変更年月日　　１９９０年　８月３１日
［変更理由］　新規登録
住　所　　東京都千代田区神田駿河台４丁目６番地
氏　名　　株式会社日立製作所